

ЎЗБЕКИСТОН РЕСПУБЛИКАСИ
ОЛИЙ ВА ЎРТА МАХСУС ТАЪЛИМ ВАЗИРЛИГИ

ФАРҒОНА ДАВЛАТ УНИВЕРСИТЕТИ

**FarDU.
ILMIY
XABARLAR-**

1995 йилдан нашр этилади
Йилда 6 марта чиқади

3-2018
ИЮНЬ

**НАУЧНЫЙ
ВЕСТНИК.
ФерГУ**

Издаётся с 1995 года
Выходит 6 раз в год

Аниқ ва табиий фанлар

МАТЕМАТИКА

А.ЮСУПОВА, М.РАҲМОНҚУЛОВА

Вазифаларни баҳолаш учун функцияларнинг хусусиятларидан фойдаланиш 5

М.АБДУМАННОПОВ

Иккинчи тартибли оддий дифференциал тенглама учун Бицадзе-Самарский ва биринчи тур интеграл шартли масала..... 10

ФИЗИКА, ТЕХНИКА

Р.Х.МАКСУДОВ, Ш.ШУХРАТОВ, Ш. ХОЛДОРОВ

Чўзилувчан камарли узатувчи механизм таранглигини ҳисоблашнинг бир усули ҳақида 14

КИМЁ

Л.ИЛЬИНА, Г.ЛАПТЕВ, Е.ЙИЛДИРИМ, С.ЗАЙЦЕВ

Кортекснинг ишлов берилмаган микроорганизмларини молекуляр генетик таҳлил қилиш учун ДНКни изоляциялаш ва тозалаш усулларини оптималлаштириш..... 20

Х.ХАЙТБАЕВ, Б.БАБАЕВ, И.ЮЛДАШЕВ, А.ХАЙТБАЕВ

Трифенилфосфин бромидли комплекс туз синтези 24

БИОЛОГИЯ, ҚИШЛОҚ ХЎЖАЛИГИ

Б.ШЕРАЛИЕВ, З.ПЕНГ

Сирдарёдан тутилиб ўрганилган оддий қора балиқнинг *Schizothorax curvifrons* (Heckel, 1838) тана массаси ва тана узунлиги ўртасидаги боғлиқлик ҳамда нисбий тўйинганлик коэффициенти..... 27

ГЕОГРАФИЯ, ТУПРОҚШУНОСЛИК

Р.ПИРНАЗАРОВ

Ўрта Осиёдаги тўғонли қўллар ва уларнинг генезиси ҳақида..... 32

Ижтимоий-гуманитар фанлар

ИҚТИСОДИЁТ

М.АДҲАМОВ

Сифат – иқтисодий ўсиш омилларидан бири 36

А.ҒОФУРОВ, Г.ХАЛМАТЖАНОВА

Кимё саноатини модернизация қилиш ва уни самарали ишлатишнинг инновацион жараёнига оид халқаро тажриба..... 40

ТАРИХ

С.ХОШИМОВ

Шўро ҳокимиятининг Бухородаги куч ишлатиш органлари тарихидан 45

Б.УСМОНОВ

Чукалак жанги 49

Х.ЖЎРАЕВ

Россия империясининг Фарғона водийсига рус аҳолисини кўчириб келтириш сиёсати тарихидан. (“Туркистон тўплами” манбалари асосида)..... 53

С.ИУЛДОШЕВ

Халқ ўйинлари- маънавий тафаккур омили..... 56

ФАЛСАФА, СИЁСАТ

У.НАЗИРОВ

Этномаданият ривожда анъананинг ўрни..... 60

УДК: 576.64

ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДОВ ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ ДНК ДЛЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА НЕКУЛЬТИВИРУЕМЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ РУБЦА КОРОВ

Л.Ильина, Г.Лаптев, Е.Йылдырым, С.Зайцев

Аннотация

Мақолада клиник жиҳатдан соғлом сигирларда жароҳат микроорганизмларининг жами ДНКларини ажратиш олиш ва тозалаш усулларини оптималлаштириш кўрсатилган.

Аннотация

В данной статье проведена оптимизация методов выделения и очистки тотальной ДНК микроорганизмов рубца у клинически здоровых коров.

Annotation

This work optimizes the methods of isolation and purification of the ruminal microorganisms' total DNA in clinically healthy cows.

Таянч сўз ва иборалар: микробиота, молекуляр-генетик анализ, ямоқ, чорва ҳайвонлари, биохимия.

Ключевые слова и выражения: микробиота, молекулярно-генетический анализ, рубец, крупный рогатый скот, биохимия.

Keywords and expressions: microbiota, molecular-genetic analysis, rumen, cattle, biochemistry.

Микробиота рубца представляет собой уникальную экологическую нишу, населенную микроорганизмами с разнообразными ферментативными системами: целлюлозоразрушающими бактериями, микромицетами, простейшими, метаногенными археями и др. [1-2]. В последние годы с применением молекулярно-генетических исследований показано, что до 90% микробиоты рубца представлено некультивируемыми и неидентифицируемыми таксонами [1,3]. Поскольку большая часть данных микроорганизмов принадлежит к строгим анаэробам, возможность их выявления классическими микробиологическими методами весьма ограничена, поскольку условия культивирования неизвестны. Установить присутствие неидентифицируемых микроорганизмов представляется возможным только молекулярно-генетическими методами анализа, основным преимуществом которых является отсутствие необходимости стадии предварительного выделения и культивирования [4]. Известно, что содержимое рубца представляет собой сложную многокомпонентную смесь различных микроорганизмов, питательных субстратов и

химических соединений, которые могут являться ингибиторами для последующего молекулярно-генетического анализа, в том числе - количественной ПЦР, T-RFLP-анализа, высокопроизводительного секвенирования.

В связи с этим целью исследования являлась оптимизация методов выделения и очистки тотальной ДНК микроорганизмов из рубца коров.

Объектами исследования было содержимое рубца клинически здоровых (n=25) дойных коров черно-пестрой породы с различным уровнем молочной продуктивности. Содержимое рубца отбирали при помощи зонда с соблюдением условий асептики в животноводческих хозяйствах Белгородской (n=1), Ленинградской (n=5), Тверской областей (n=1) и Краснодарского края (n=3).

Тотальную ДНК выделяли двумя способами: с помощью буфера на основе раствора СТАВ с последующей фенол-хлороформной экстракцией, а также буфера на основе раствора SDS с последующей фенол-хлороформной экстракцией.

Метод выделения тотальной ДНК с помощью буфера на основе СТАВ включал нижеследующие этапы. На первом этапе к каждой пробе добавляли 500 мкл буфера I (СТАВ 2%; Tris-HCl 0,1M; ЭДТА-Na₂ 20 мМ; NaCl 1,4 M; pH 8,5) и 0,5 г стеклянных шариков. Пробы прогревали в течение 15 мин при 65°С. Далее образцы гомогенизировали в течение 15 мин на

Л.Ильина – кандидат биологических наук, зав. лабораторией ООО «БИОТРОФ+», ФГБОУ ВО СПбГАУ, Санкт-Петербург, РФ.
Г.Лаптев – доктор биологических наук, директор ООО «БИОТРОФ+», ФГБОУ ВО СПбГАУ, Санкт-Петербург, РФ.
Е.Йылдырым – кандидат биологических наук, биотехнолог ООО «БИОТРОФ+», ФГБОУ ВО СПбГАУ, Санкт-Петербург, РФ.
С.Зайцев – доктор биологических наук, доктор химических наук, профессор, зав. кафедрой химии ФГБОУ ВО МГАВМиБ - МВА имени К.И.Скрябина, Москва, РФ.

вортексе (при максимальной скорости встряхивания). Затем прогревание повторяли в течение 15 мин. Далее экстрагировали пробы хлороформом. После этого осаждали ДНК 96% спиртом и растворяли в 100 мкл буфера TE (Tris-HCl 10 mM; ЭДТА-Na₂ 1 mM).

Метод выделения тотальной ДНК с помощью буфера на основе SDS включал следующие этапы. На первом этапе к каждой пробе добавляли 500 мкл буфера I (SDS 2%; Tris-HCl 20 mM; ЭДТА-Na₂ 20 mM; NaCl 2 M; pH 8,0) и 0,5 г стеклянных шариков. Пробы прогревали в течение 15 мин при 65°C. Далее образцы гомогенизировали в течение 15 мин на вортексе (при максимальной скорости встряхивания). Затем прогревание повторяли в течение 15 мин. Пробы экстрагировали смесью фенол/хлороформ (1:1), затем хлороформом. После этого осаждали ДНК 96% спиртом и растворяли в 100 мкл буфера TE (Tris-HCl 10 mM; ЭДТА-Na₂ 1 mM).

Тотальную ДНК, выделенную из образцов рубцового содержимого, очищали с помощью трех методов: в агарозных блоках, с помощью раствора СТАВ, а также с помощью ДНК-сорбента Silica.

Очистка ДНК в агарозных блоках включала следующие этапы. На первом этапе 50 мкл ДНК смешивали с 50 мкл расплавленной 1,6% легкоплавкой агарозы (Sigma). После застывания агарозы добавляли 1,5 мл буфера TE и промывали блоки в течение 6 часов. Затем блоки агарозы расплавляли при 65°C. Далее пробы экстрагировали фенолом, смесью фенол/хлороформ (1:1) и хлороформом. К супернатанту добавляли ацетат натрия до конечной концентрации 0,3 M, осаждали ДНК 96% спиртом, промывали 70%-ным спиртом и растворяли в 50 мкл воды.

Очистка ДНК с помощью раствора СТАВ состояла из следующих стадий. К 50 мкл суммарной ДНК добавляли 150 мкл раствора TE, 200 мкл раствора СТАВ (СТАВ 2%; Tris-HCl 0,1M; ЭДТА-Na₂ 10 mM; NaCl 0,9 M; pH 8,0) и осаждали. Супернатант сливали, растворяли полученный осадок в 200 мкл раствора СТАВ, далее добавляли 200 мкл TE и снова осаждали. Супернатант сливали, растворяли осадок в 400 мкл 1M NaCl и экстрагировали хлороформом. К супернатанту добавляли ацетат натрия до конечной концентрации 0,3 M. ДНК осаждали изопропанолом, промывали 70%-ным этанолом и растворяли в 50 мкл воды.

Очистка ДНК с помощью ДНК-сорбента Silica включала следующие этапы. К 50 мкл ДНК добавляли 50 мкл раствора А (3 M гуанидин-изотиоцианат, 20 mM EDTA-Na₂, 10

mM Tris-HCl (pH 6,8), 40 мг/мл TritonX-100), перемешивали и добавляли 20 мкл раствора В (1000 мкл раствора А, 40 мг/мл ДНК-сорбента Silica). Пробы инкубировали 10 мин при комнатной температуре, периодически перемешивая. Далее ДНК с сорбентом осаждали при 4000 об/мин в течение 1 минуты и полностью отбирали раствор. Далее аналогичным образом промывали осадок с Silica с ДНК растворами А, С (25% C₂H₅OH, 25% изопропанол, 100 mM NaCl, 10 mM TRIS-HCl, pH 8,0) и 70% спиртом. После этого осадок высушивали и элюировали ДНК в 50 мкл раствора 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) в течение 15 мин при комнатной температуре. Далее раствор центрифугировали 3 мин при 14000 об/мин. и отбирали в новые пробирки очищенный препарат ДНК.

Чистоту препарата выделенной и очищенной ДНК оценивали с помощью гелеэлектрофореза в 1% агарозном геле [5].

На первом этапе исследований нами была выполнена оптимизация условий выделения ДНК из рубцовой жидкости коров. Для выбора оптимального способа экстракции ДНК мы использовали два метода, включающие лизис клеточных стенок с помощью раствора СТАВ или раствора SDS, далее следовала гомогенизация образцов стеклянными шариками и последующая стадия фенол-хлороформной экстракции.

Результаты визуальной оценки электрофореграммы показали, что использование метода экстракции ДНК из содержимого рубца коров на основе раствора SDS позволяет получить большее количество геномной ДНК, чем применение метода на основе раствора СТАВ (рис. 1).

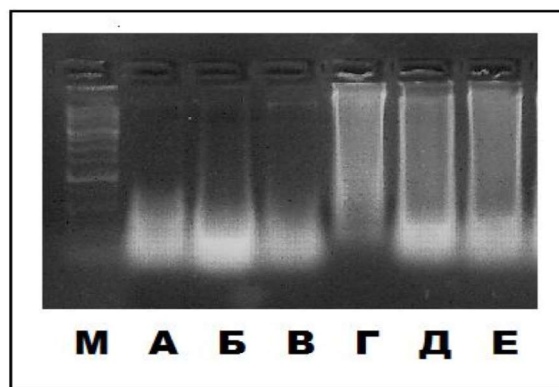


Рис. 1. Электрофореграмма геномной ДНК, выделенной из рубцовой жидкости коров:

А, Б, В – ДНК выделена с помощью буфера на основе СТАВ; Г, Д, Е – ДНК выделена с помощью буфера на основе SDS; М – маркер молекулярного веса (GeneRuler 100+ п.н., Fermentas).

Следует отметить, что раствор геномной ДНК из образцов рубцового содержимого, выделенной с помощью обоих методов, имел коричневый оттенок, что свидетельствует о наличии примесей в растворе. Кроме того, в процессе выделения ДНК с помощью метода на основе буфера SDS на стадии инкубации ДНК, после этапа добавления изопропанола к материалу, образовывался поверхностный плотный слой примесей (белков и жиров), который визуализировался на электрофореграмме. Данные загрязняющие примеси претерпевали осаждение вместе с ДНК, поэтому качество геномной ДНК из содержимого рубца не представлялась удовлетворительным для дальнейшего молекулярно-генетического анализа.

В связи с этим, следующим этапом был подбор метода очистки полученных образцов ДНК. Для очистки ДНК от загрязняющих примесей мы использовали три наиболее, на наш взгляд, применимые в данном случае методики:

- 1) очистку методом отмывки ДНК в агарозных блоках;
- 2) очистку ДНК с помощью раствора СТАВ;
- 3) очистку с помощью ДНК-сорбента Silica.

Результаты показали, что все методы позволили эффективно очистить образцы геномной ДНК, при этом качество ДНК практически не различалось, что отражено на электрофореграмме (рис. 2).

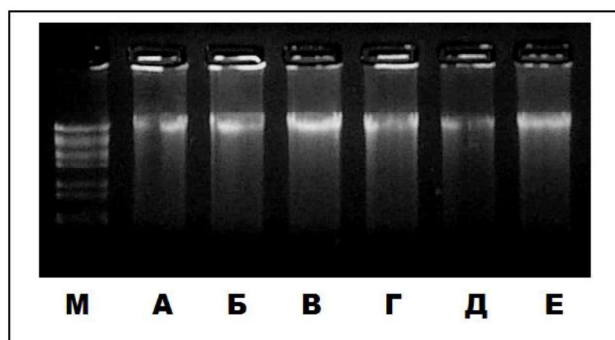


Рис. 2. Электрофореграмма геномной ДНК:
 А, Б – ДНК очищена с помощью легкоплавкой агарозы;
 В, Г - ДНК очищена с помощью буфера на основе СТАВ;
 Д, Е - ДНК очищена с помощью Silica;
 М – маркер молекулярного веса (GeneRuler 100 п.н., Fermentas).

Несмотря на широкий спектр современных возможностей для изучения микробиома рубца жвачных, основной проблемой является возможность более полного экстрагирования геномной ДНК из образцов рубцового содержимого. В настоящее время исследователями для выделения ДНК и удаления загрязняющих веществ из образцов содержимого рубца жвачных и ЖКТ животных опробованы различные методики, включающие ферментативный лизис (с помощью лизоцима, протеиназы К, додецилсульфата натрия - SDS), лизис с помощью замораживания-оттаивания образцов [6], метод дробления клеточных стенок микроорганизмов стеклянными шариками [7], а также использованы коммерческие наборы, такие как QIAamp® ДНК Stool Mini Kit (QIAGEN, Inc., Valencia, CA, USA) [8].

Для выбора оптимального способа экстракции ДНК мы использовали два метода, различающихся по методам лизиса клеточных стенок: раствором СТАВ и раствором SDS. Данные методы были выбраны исходя из результатов исследователей [9], использующих в своей работе для экстракции ДНК из образцов фекалий методы, включающие механохимический лизис - стеклянными шариками в присутствии мощных соединений. Исследования показали, что применение данных экстрагирующих растворов должно обеспечить защиту ДНК от деградации нуклеазами, активными в содержимом рубца [10]. Результаты, полученные нами, продемонстрировали, что метод экстракции ДНК из содержимого рубца коров на основе раствора SDS позволили получить большее количество ДНК (судя по свечению на электрофореграмме) из образцов рубцовой жидкости коров. Это позволяет рекомендовать данный метод для выделения ДНК из содержимого рубца коров.

Кроме того, одной из проблем при выделении ДНК из рубца являются загрязняющие вещества (белки, жиры, полисахариды и нуклеазы), которые могут препятствовать дальнейшему метагеномному анализу микробного сообщества, в т.ч. проведению количественной ПЦР, T-RFLP-анализа,

высокопроизводительного секвенирования [11]. Для очистки ДНК от загрязняющих веществ мы использовали три различные методики: очистку методом отмывки ДНК в агарозных блоках, очистку ДНК с помощью раствора СТАВ, очистку с помощью ДНК-сорбента Silica. Результаты показали, что все методы, использованные нами, позволили эффективно очистить образцы геномной ДНК, при этом качество ДНК практически не различалось между вариантами.

Таким образом, проведена оптимизация методов выделения и очистки тотальной ДНК микроорганизмов рубца у клинически здоровых коров. Полученные

результаты позволяют повысить эффективность проведения молекулярно-генетического анализа (количественной ПЦР, T-RFLP-анализа, высокопроизводительного секвенирования и т.д.) микроорганизмов содержимого рубца.

Исследование выполнено при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований при реализации проекта №18-016-00207 «Изучение неидентифицируемых микроорганизмов рубца крупного рогатого скота при различных питательных рационах в связи со здоровьем и продуктивностью животных».

Литература:

1. Van Soest P.J. Nutritional ecology of the ruminant. 2nd edn. Cornell University Press, Ithaca, New, 1994.
2. Hungate R.E. A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. In: Norris J.R., Ribbons D.W. (eds). *Methods in microbiology*, vol. 3B. Academic Press, London and New York, p. 117–132, 1969.
3. Dehority B.A, Tirabasso P.A, Grifo AP. Most-probable-number procedures for enumerating ruminal bacteria, including the simultaneous estimation of total and cellulolytic numbers in one medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:2789–2792, 1989.
4. Amann R.I., Ludwig W., Schleifer K.H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59:143–169, 1995.
5. Брюханов А.Л., Рыбак К.В., Нетрусов А.И. Молекулярная биология. М.: Изд-во МУ, 2012. -480 с.
6. Kocherginskaya S., Aminov, R. I. and White, B. A. Analysis of the rumen bacterial diversity under two different diet conditions using denaturing gradient gel electrophoresis, random sequencing, and statistical ecology approaches // *Anaerobe.* - 2001. – Vol.7. -P.119-134.
7. Forster R., J. Gong, and R. Teather. Group-specific 16S rRNA hybridization probes for determinative and community structure studies of *Butyrivibrio fibrisolvens* in the rumen // *Appl. Environ. Microbiol.* - 1997. – Vol.63.- P.1256-1260.
8. Whitehead T.R. and M.A. Cotta. Characterization and comparison of microbial populations in swine faeces and manure storage pits by 16S rDNA gene sequence analyses // *Anaerobe.* - 2001. – Vol.7. -P.181-187
9. Yu Z. and M. Morrison. Comparisons of different hypervariable regions of *rrs* genes for use in fingerprinting of microbial communities by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis // *Appl. Environ. Microbiol.* - 2004. – Vol.70. №8.- P.4800-4806.
10. Flint H.J., A.M. Thomson. Deoxyribonuclease activity in isolated rumen bacteria and rumen fluid // *Lett. Appl. Microbiol.* - 1990. – Vol.11. -P.18-21.
11. Tebbe C. C. and W. Vahjen. Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and a yeast // *Appl. Environ. Microbiol.* - 1993. – Vol.59. -P.2657-2665.