

**БИОТЕХНОЛОГИЯ  
BIOTECHNOLOGY**

УДК: 632.932:599(575.2)(04)

**Досойбекова Мырзайым,**  
*магистрант,**Кыргызский Национальный университет им. Ж. Баласагына***Dosoybekova Myrzaym,**  
*master's degree student,**Kyrgyz National University named after J. Balasagyn***Исаева Венера Карабековна,***к.б.н., доцент, зав.кафедрой ботаники и физиологии растений биологического факультета Кыргызского Национального университета им. Ж. Баласагына***Isaeva Venera Karabekovna,***candidate of biological sciences, associate professor, head of the department of botany and plant physiology, faculty of biology, Kyrgyz National University. named after J. Balasagyn***Жунушов Асанкадыр Темирбекович,***профессор, док.вет.наук, член-корр. НАН КР,  
директор Института биотехнологии НАН КР***Zhunushov Asankadyr Temirbekovich,***professor, doctor of veterinary sciences, corresponding member NAS KR,  
director of the Institute of biotechnology of the NAS KR***ВЫДЕЛЕНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ИЗ ВНУТРЕННИХ  
ОРГАНОВ ГРЫЗУНОВ**

**Аннотация.** Исследования по выделению нуклеиновых кислот из внутренних органов грызунов проводились в лаборатории биотехнологии и питания Института биотехнологии НАН КР. Целью данного исследования являлось изучение методов выделения нуклеиновых кислот из внутренних органов грызунов. В процессе исследования были освоены методики выделения ДНК и РНК из разных образцов биологических объектов. Метод проведения качественного и количественного учета выделенных ДНК и РНК из образцов производился с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000. По результатам исследования у 25 образцов ДНК и 24 образцов РНК были допускаемые концентрации в пределах от 84,3 до 630,5, что позволило использовать их для дальнейших исследований.

**Ключевые слова:** ДНК и РНК биологических объектов, качественный и количественный учет.

**НУКЛЕИН КИСЛОТАЛАРЫН КЕМИРҮҮЧҮЛӨРДҮН  
ИЧКИ ОРГАНДАРЫНАН БӨЛҮП АЛУУ**

**Аннотация.** Нуклеин кислоталарын кемирүүчүлөрдүн ички органдарынан бөлүп алуу боюнча изилдөө иштери Кыргыз Республикасынын Улуттук Илимдер Академиясынын Биотехнология институтунда биотехнология жана тамактануу лабораториясында жүргүзүлдү.

Бул изилдөөнүн максаты - кемирүүчүлөрдүн ички органдарынан нуклеин кислоталарын бөлүп алуу ыкмаларын изилдөө. Изилдөөнүн жүрүшүндө биологиялык объектилердин ар кандай үлгүлөрүнөн ДНКны жана РНКны бөлүп алуу жолдору өздөштүрүлдү. Үлгүлөрдөн бөлүнүп алынган ДНКны жана РНКны сапаттык жана сандык каттоонун ыкмасы NanoDrop 2000 спектрофотометр менен жүргүзүлдү. Изилдөөнүн жыйынтыгында, 25 ДНК жана 24 РНК үлгүлөрү жол берилүүчү чектелген концентрацияга ээ болушкан 84,3төн 630,5ке чейин, бул аларды андан ары изилдөө үчүн колдонууга мүмкүндүк берген.

**Негизги сөздөр:** *биологиялык объектилердин ДНКсы жана РНКсы, сапаттык жана сандык каттоо.*

## RELEASE OF NUCLEIC ACIDS FROM THE INTERNAL ORGANS OF RODENTS

**Abstract.** Studies on the isolation of nucleic acids from the internal organs of rodents were carried out at the Institute of Biotechnology of the National Academy of Sciences of the Kyrgyz Republic in the laboratory of biotechnology and nutrition. The aim of this study was to study methods for the isolation of nucleic acids from the internal organs of rodents. In the course of the research, the methods of DNA and RNA isolation from different samples of biological objects were mastered. The method of qualitative and quantitative accounting of DNA and RNA isolated from samples was carried out using a Nano Drop 2000 spectrophotometer. According to the results of the study, 25 DNA samples and 24 RNA samples had admissible concentrations 84,3 – 630,5 9, which made it possible to use them for further research.

**Key words:** *DNA and RNA of biological objects; qualitative and quantitative accounting.*

### Введение

В настоящее время молекулярная генетика одна из самых быстроразвивающихся и перспективных отраслей науки. Ученые всего мира стараются внести свой вклад в развитие молекулярно-генетических методов исследования.

Существуют различные методы, позволяющие выделять нуклеиновые кислоты из широкого спектра образцов, но лишь малое их число пригодно для автоматизации и на многих стадиях выделения есть высокий риск контаминации [5]. Процедура выделения нуклеиновых кислот из клеток и тканей часто является исходным этапом в исследовании живого организма на молекулярном уровне.

Исследования грызунов на наличие зоонозных инфекций в Кыргызстане были начаты в 1939 году. Были выявлены такие природно-очаговые заболевания, как лептоспироз, туляремия, бруцеллез и сибирская язва [1,4]. Начиная с 1994 года по настоящее время, объединенными усилиями кыргызских и казахских исследователей

проводилось изучение серой крысы, а с 2010 года – других видов грызунов [3].

Заболевания грызунов, выявленные ранее, ученым ветеринаром Б.М. Айзиным (1979) не диагностировались, но автор не исключает их наличие [1,2].

Целью данного исследования являлось изучение методов выделения нуклеиновых кислот из внутренних органов грызунов.

Для достижения этой цели необходимо ознакомиться с основными методами выделения ДНК и РНК, освоить методику проведения качественного и количественного учета выделенных ДНК и РНК образцов с помощью спектрофотометра, освоить методику учета выделенной ДНК и РНК (качественный анализ) в процессе агарозного гель-электрофореза.

### Материалы и методы

Биологические материалы были собраны в Чуйской области в Аламединском и Ысык-Атинском районах (с. Суусамыр, Чон-Кемин, с. Торт-Куль), а также в Ноокатском районе Ошской области. Всего было

собрано 150 образцов, для выделения ДНК были взяты всего 35 грызунов: слепушонка – 2, мышь лесная- 19, полевая мышь-3, краснохвостая песчанка-3, ондатра-7, серая крыса-1, а также для выделения РНК были взяты 32 грызуна: слепушонка-2, серая мышь-1, лесная мышь-8, краснохвостая песчанка-4, полевка-8, ондатра-5, мышь полевая-4.

**Препарирование мышей.** Согласно методике изолированного извлечения вскрывать животных следует сразу же после их гибели, чтобы посторонняя микрофлора не исказила результаты опыта. Применяют только стерильные инструменты: скальпели, ножницы, пинцеты.

Трупы мелких мышей кладут на спину, растягивают в стороны лапы, прикалывают их к доске или кювете с парафином. Можно использовать специальные столики, снабженные соответствующими фиксирующими приспособлениями. Производят осмотр наружных покровов, отмечая наличие язв, выпадение шерсти, изменения цвета кожи и др.

Перед вскрытием труп животного смачивают дезинфицирующим раствором или спиртом. Инструменты переносят из стерилизатора в банку со спиртом, а перед употреблением их обжигают в пламени горелки. После вскрытия труп животного стерилизуют, все инструменты, доску и кювету дезинфицируют или также стерилизуют.

Для выделения ДНК из образцов мышей брались органы: селезенка, печень, легкие. Предварительно все органы были измельчены и переложены в пробирку типа «эппендорф». В пробирку добавлялся лизисный раствор.

Выделение геномной ДНК и РНК. Выделение геномной ДНК проводилось согласно протоколу производителя QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Германия) и РНК проводилось согласно протоколу производителя Promega USA (Total RNA Purification).

**Спектрофотометр.** Для проведения спектрофотометрического анализа, предварительно необходимо нанести 1,5 мкл буфера АЕ на неподвижный модуль прибора. Затем наносится 1,5 мкл образца на неподвижный модуль прибора, после он отпускается. В результате чего из образца формируется столбик жидкости между подвижным и неподвижным модулем [5]. Результаты спектрофотометра выводятся на экран компьютера.

**Гель-электрофорез.** Материалы и оборудование. Агарозный гель, раствор ДНК животного происхождения, маркер молекулярного веса (коммерческий препарат) или ДНК фага  $\lambda$ , рестрицированная HindIII, источник тока, камера для электрофореза, УФ-транслюминатор.

#### **Растворы:**

- 10 буфер для нанесения образцов: 0,025 г бромфенолового синего БФС; 4 мл глицерина; 5 мл 0,5М ЭДТА, рН 8,0; довести до 10 мл бидистиллятом.

#### **Методика**

1. Поместить плашку с гелем в электрофорезную камеру, залить 1 буфер ТАЕ так, чтобы он полностью покрыл агарозу (рис. 1).

2. Смешать 10 мкл раствора ДНК и 1 мкл 10 буфера для нанесения образцов на гель в пробирке, в лунке малого иммунологического планшета или просто на поверхности тефлоновой гребенки. Тщательно пипетировать.

3. Нанести образцы микропипеткой в лунку геля (рис. 2).

4. Нанести маркер молекулярного веса в соседнюю лунку геля.

5. Включить источник тока и провести электрофорез при напряжении 100 В в течение 1,5–2 ч (до выхода лидирующего красителя БФС из геля).

6. Отключить ток, вынуть плашку и просмотреть гель в УФ свете.

7. Сфотографировать гель цифровой фотокамерой.

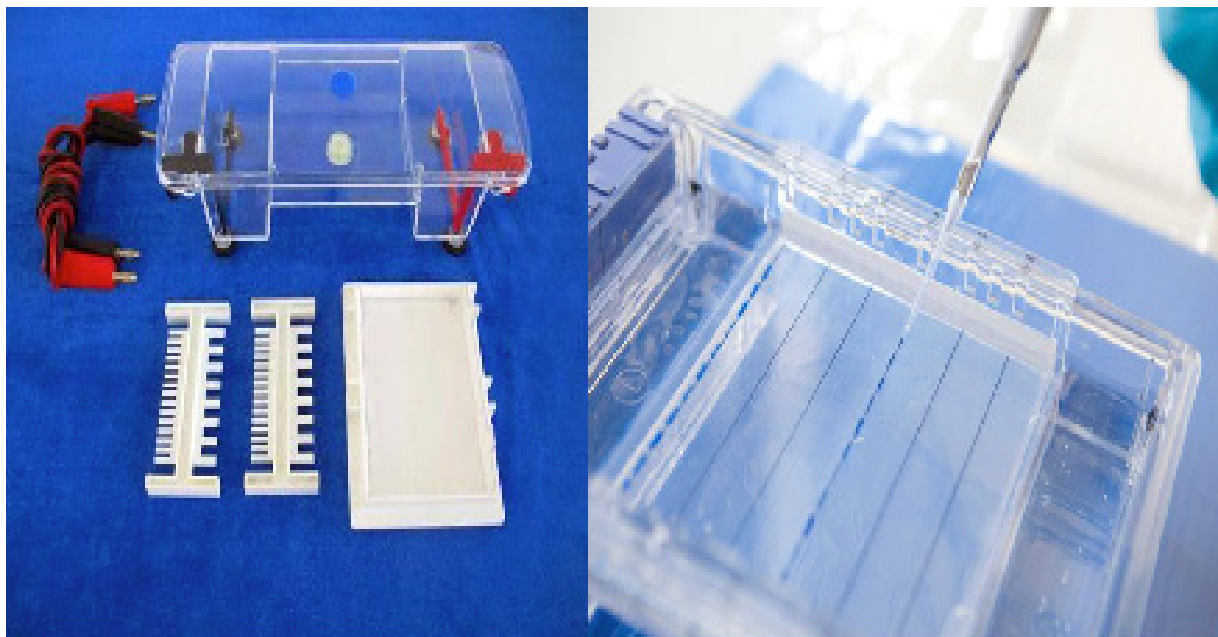


Рис. 1. Заливочный столик

Рис. 2. Нанесение образцов на гель

### Результаты и их обсуждение

Исследования проводились в лаборатории биотехнологии и питания Института биотехнологии НАН КР. Материалом для исследований послужили внутренние органы грызунов - это легкие, селезенка, печень. Геномная ДНК выделена из тканей органов грызунов из 0,25 мкл замороженной ткани с использованием набора реагентов «QIAamp DNA» Mini Kit (QIAGEN) Германия, согласно протоколу, предоставленного изготовителем. РНК выделена из тканей органов грызунов из 0,20 мкл замороженной ткани с использованием набора реагентов «Promega USA» (Total RNA Purification) согласно прописи, предоставленной изготовителем.

**Проверка качества ДНК на спектрофотометре.** Количественное и качественное определение выделенной ДНК на спектрофотометре NanoDrop 2000

(Thermo Scientific).[7] Для проведения анализа на спектрофотометре NanoDrop 2000 были взяты 35 образцов ДНК, 25 из которых были допустимой концентрации.

Препарированием из брюшной полости грызунов извлекались внутренние органы: легкие, печень и селезенка. Метод проведения качественного и количественного учета выделенных ДНК и РНК из образцов производился с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000. Читка нуклеотидных последовательностей проведена с помощью последовательности полосок, проявляемых на агарозном геле после гель-электрофореза [6].

Биологические материалы были собраны в Аламединском и Ысык-Атинском районах Чуйской области (таб. 1). На результатах видно, что у 25 образцов чистая ДНК с концентрацией 260/280 нм от 1,8 до 2.00 [8].

Таблица 1.

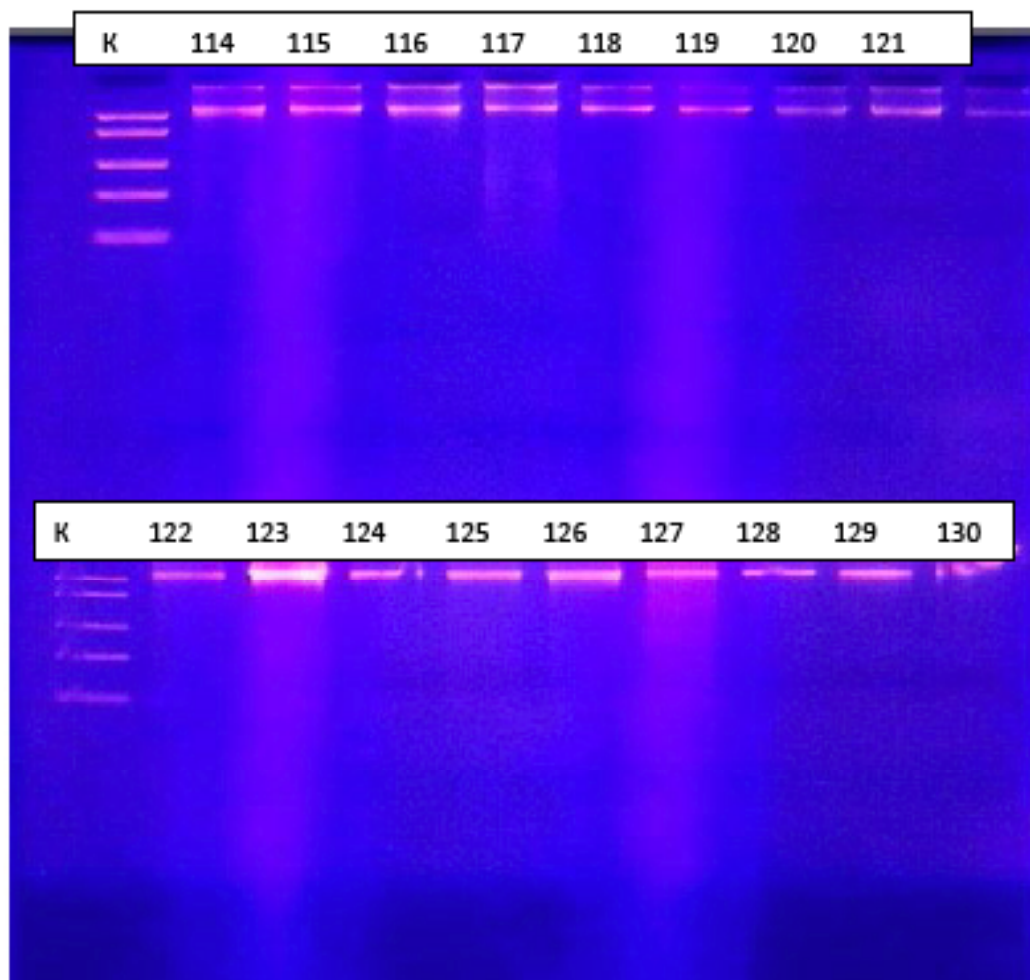
## Результаты спектрофотометра дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК)

№	ID образца	Концентрация нукл. к-ты	260/280 нм
1	114 слепушонка	37,9	1,96
2	115 слепушонка	48,3	1,97
3	116 серая крыса	36,5	1,63
4	117 мышь лесная	42,8	2,09
5	118 мышь лесная	153,6	1,13
6	119 мышь лесная	20,8	2,15
7	120 мышь лесная	22	2,3
8	121 мышь лесная	18,2	2,32
9	122 мышь лесная	52,8	2
10	123 мышь лесная	54,7	1,9
11	124 мышь лесная	11,7	2,34
12	125 мышь лесная	22,1	1,96
13	126 мышь лесная	15,9	1,88
14	127 мышь лесная	92	2,08
15	128 мышь лесная	15,7	2,19
16	129 краснохвостая песчанка	17,1	2,05
17	130 краснохвостая песчанка	43,4	1,92
18	131 мышь полевая	20,9	2,14
19	132 мышь полевая	31,4	1,92
20	133 мышь полевая	301,3	2,12
21	134 краснохвостая песчанка	56,3	1,99
22	135 ондатра	15,9	2,11
23	136 ондатра	20	1,85
24	137 ондатра	17,5	1,96
25	138 ондатра	27,2	2,69
26	139 ондатра	131,3	1,81
27	140 ондатра	74,6	1,84
28	141 ондатра	42,1	1,82
29	142 мышь лесная	29,7	1,87
30	143 мышь лесная	48,8	1,94
31	144 мышь лесная	52,9	1,88
32	145 мышь лесная	18,2	1,92
33	146 мышь лесная	57,8	1,78
34	147 мышь лесная	10	2,05
35	148 мышь лесная	9	1,77



Содержание дезоксирибонуклеиновых кислот в растворе колебалось в пределах 9 – 301,3. Концентрация ДНК в растворе у образцов 114, 115, 117, 119, 122, 123, 125-127, 129-134, 136, 137, 139-145, 147 были в диапазоне от 1,8 до 2,00, что означает чистоту исследуемого материала.

#### Результаты выделенной ДНК из образцов на гель-электрофорезе



**Рис. 3.** Верхние образцы слева на право К-контрольный ДНК маркер (100 п.н.), 114-121 образцы ДНК; нижние образцы слева на право К-контрольный ДНК маркер 100 (п.н.), 122-130.

Результаты гель-электрофореза (рис. 3) еще раз доказывают получение высококонцентрированного исследуемого материала для дальнейшего изучения. Образцы 115, 117, 119, 123, 127, 133, 137, 139, 142 и 146 на электрофореграмме показали более высокое соответствие к контрольным ДНК-маркерам.

Проверка качества РНК на спектрофотометре. Биологические материалы были собраны в Ноокатском районе Ошской

области, в селах Суусамыр, Чон-Кемин и Торт-Куль Чуйской области.

По таблице 2 и на рисунке 4 видны, что все исследуемые образцы РНК высокой концентрации. Содержание рибонуклеиновых кислот в растворе колебалось в пределах 84,3 – 630,5. Спектрофотометрические анализы во всех диапазонах 260/230 нм были в пределах 1,98-2,48.

Таблица 2.

**Спектрофотометрические анализы из образцов  
рибонуклеиновой кислоты (РНК)**

<b>№</b>	<b>ID образца</b>	<b>Концентрация нукл. к-ты</b>	<b>260/230нм</b>
1	69 слепушонка	236,4	2,22
2	70 слепушонка	628	2, 27
3	26 серая мышь	332,4	2,21
4	27 мышь лесная	203,7	1,98
5	28 мышь лесная	248,5	2,26
6	29 краснохвостая песчанка	434,2	2,36
7	30 краснохвостая песчанка	283,5	2,48
8	31 полевка	199,8	2,22
9	32 полевка	230,6	2,29
10	41 ондатра	250,5	2,18
11	42 ондатра	359,5	2,21
12	43 мышь полевая	371,8	2,21
13	44 мышь полевая	277,9	2,25
14	45 мышь лесная	408,5	2,18
15	46 мышь лесная	233,2	2.22
16	47 мышь лесная	222,2	2,13
17	48 полевка	199	2,42
18	49 полевка	376,5	2,34
19	81 полевка	719,3	2,29
20	82 полевка	256,3	2,16
21	83 ондатра	566.6	2,21
22	84 мышь полевая	213,7	2,24
23	85 мышь полевая	182,1	2,46
24	98 ондатра	255,5	1,99
25	99 ондатра	159	2,39
26	100 краснохвостая песчанка	255,9	2,17
27	101 краснохвостая песчанка	268,6	2,36
28	102 полевка	436,2	2,18
29	103 полевка	313,6	2,21
30	71 мышь лесная	299,2	2,2
31	72 мышь лесная	84,3	2,2
32	73 мышь лесная	630,5	2,28

## Результаты электрофореза РНК

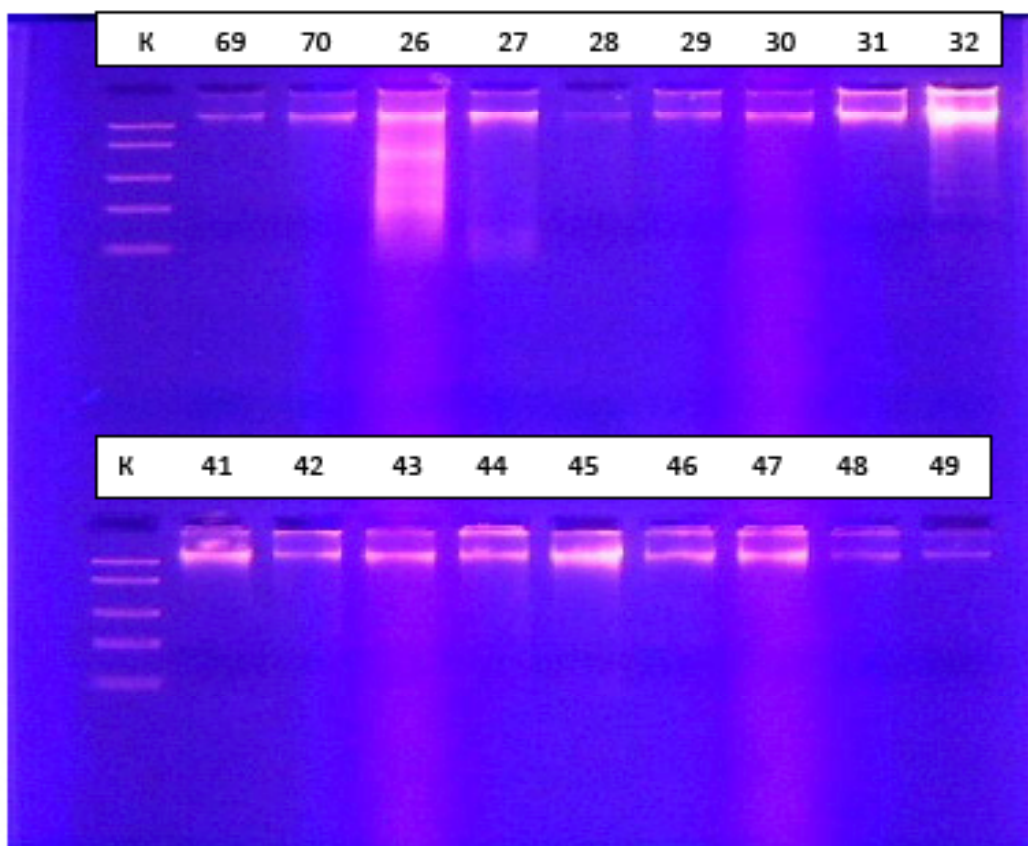


Рис. 4. Верхние образцы слева на право К-контрольный РНК маркер (100 п.н.), 69-32 образцы РНК; нижние образцы слева на право К-контрольный РНК маркер 100 (п.н.), 41-49.

Из результатов видно, что у 25 образцов ДНК и 24 образцов РНК была допустимая концентрация 260/280 нм от 1,8 до 2,00, 260/230 нм от 2,2 и выше, что позволило использовать их для дальнейших исследований.

#### Выводы

1. Освоены методики выделения ДНК и РНК из разных образцов биологических объектов: слепушонки, лесные мыши, краснохвостые песчанки, ондатры, серые крысы, полевки.

2. Препарированием из брюшной полости грызунов извлекались внутренние органы: легкие, печень и селезенка.

3. Метод проведения качественного и количественного учета выделенных ДНК и РНК из образцов производился с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000. Из результатов видно, что у 25 образцов ДНК и 24 образцов РНК была допустимая концентрация, что позволило использовать их для дальнейших исследований.

4. Использованный метод учета выделенной ДНК и РНК (качественный анализ) в процессе агарозного гель-электрофореза на разделение фрагментов. Читка нуклеотидных последовательностей проведена с помощью последовательности полосок, проявляемых на агарозном геле после гель-электрофореза.



### Литература

1. Айзин Б. М. (1912-). Грызуны и зайцеобразные Киргизии: Экология, роль в поддержании природ. очагов некоторых заболеваний. - Фрунзе: Илим, 1979. - 200 с.
2. Алымкулова А.А., Мека-Меченко Т.В., Мусуралиева Д.Н., Бурделов Л.А., Некрасова Л.Е., Мека-Меченко В.Г., Бемяк Л.Г. Зараженность грызунов некоторыми зоонозными инфекциями в открытых стациях Иссык-Кульской области // Вестник, КРСУ 2012. Т. 12, №7. С. 11.
3. Алымкулова А.А., Таштанбекова М.М., Купсуралиева И.К., Бурделов Л.А. Современное распространение серой крысы в Кыргызстане и ее цветовые формы // Каратинные и зоонозные инфекции в Казахстане.-2005.-вып.1-2.-С. 83-88.
4. Жунушов А.Т., Маткариом С.А., Гайбулин Дж.Ш., Гаврилова О.Н. Ж 89 «Сибирская язва в Кыргызской Республике (проблемы, опыт и перспективы борьбы с ней.) – Б., Бийиктик, 2013.- С. 7-10.
5. Никитин В. А. Спектрофотометр // Физическая энциклопедия / Гл. ред. А. М. Прохоров. — М.: Большая Российская энциклопедия, 1994. — Т. 4. — С. 626. — 704 с. — 40 000 экз. — ISBN 5-85270-087-8.
6. *Bowtell D.D.* Rapid Isolation of Eukaryotic DNA // *Anal. Biochem.* 1987. V. 162. P. 463–465
7. *Glasel J.* Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios (англ.) // *BioTechniques* (англ.) русск. : journal. — 1995. — Vol. 18, no. 1. — P. 62—63. — PMID 7702855.)
8. Sambrook and Russell. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (неопр.). — 3rd. — Cold Spring Harbor Laboratory Press (англ.) русск., 2001. — ISBN 978-087969577-4.