

---

**ОПТИМІЗАЦІЯ МЕТОДУ ВИДІЛЕННЯ ДНК З ВИКОПНИХ РЕШТОК**

---

**Н. Б. МОХНАЧОВА, Л. Ф. СТАРОДУБ, М. Л. ДОБРЯНСЬКА***Інститут розведення і генетики тварин імені М.В.Зубця НААН (Чубинське, Україна)**<https://orcid.org/0000-0001-5982-6542> – Н. Б. Мохначова**<https://orcid.org/0000-0002-9565-807X> – Л. Ф. Стародуб**<https://orcid.org/0000-0001-9216-0527> – М. Л. Добрянська  
nm82@i.ua*

*Стаття присвячена вирішенню проблеми виділення генетичного матеріалу із викопних решток, що використовуються для доповнення палеонтологічних даних. В результаті роботи було проведено оптимізацію методики екстракції ДНК із викопних решток, а саме – кісток та зубів тварин роду *Eguus*, датованих віком близько 4,5–10 тис. років до н. е. (плейстоценового коня та тарпана). На основі отриманих фрагментів ДНК були проведено полімеразну ланцюгову реакцію з використанням в якості праймерів ISSR-маркерів. Умови проведення полімеразної ланцюгової реакції було модифіковано в зв'язку з використанням специфічного генетичного матеріалу.*

**Ключові слова:** ДНК, ISSR, ПЛР, викопні рештки

**OPTIMIZATION OF THE METHOD OF DNA ISOLATION FROM FOSSILS****N. B. Mokhnachova, L. F. Starodub, M. L. Dobryanska***Institute of Animal Breeding and Genetic nd. a. M.V.Zubets of NAAS (Chubynske, Ukraine)*

*The article is devoted to solving the problem of isolation of genetic material from fossil remains used to supplement paleontological data. As a result of the work, the method of DNA extraction from fossil remains was optimized, namely, bones and teeth of animals of the genus *Eguus* dating back to the age of about 4.5–10 thousand years BC. (Pleistocene horse and tarpan). Based on the obtained DNA fragments, polymerase chain reaction was performed using ISSR markers as primers. The conditions of the polymerase chain reaction were modified due to the use of specific genetic material.*

**Keywords:** DNA, ISSR, PCR, fossils

**ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДА ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК ИЗ ИСКОПАЕМЫХ ОСТАТКОВ****Н. Б. Мохначова, Л. Ф. Стародуб, М. Л. Добрянская***Інститут розведення і генетики животнох імені М.В.Зубця (Чубинське, Україна)*

*Стаття посвячена решению проблемы выделения генетического материала из ископаемых остатков, используемых для дополнения палеонтологических данных. В результате работы была проведена оптимизация методики экстракции ДНК из ископаемых остатков, а именно – костей и зубов животных рода *Eguus*, датированных возрастом около 4,5–10 тыс. лет до н. э. (плейстоценовой лошади и тарпана). На основе полученных фрагментов ДНК была проведена полимеразная цепная реакция с использованием в качестве праймеров ISSR-маркеров. Условия проведения полимеразной цепной реакции были модифицированы в связи с использованием специфического генетического материала.*

**Ключевые слова:** ДНК, ISSR, ПЦР, ископаемые остатки

**Вступ.** Палеогенетика – галузь генетики, що за допомогою молекулярно-генетичних даних, отриманих із викопних решток біологічних об'єктів, сприяє вирішенню проблем палеон-

тології. Це один з наймолодших напрямків в генетиці. Найперші роботи в цій галузі були опубліковані в першій половині 80-х років ХХ століття. Бурхливий розвиток її відбувається протягом останніх 10 років.

Основним завданням палеогенетики є отримання і аналіз давньої ДНК, адже фрагменти ДНК можуть зберегтися у викопних рештках істот через тисячі років після їх смерті. Найдавніша ДНК отримана із кісток дикого коня віком біля 700 тисяч років, що добре зберігся в вічній мерзлоті Аляски [1].

Історія походження та domestикація сільськогосподарських тварин завжди цікавила людство. Проте, ці питання в літературі висвітлюються досить докладно лише з часу, коли вже склалися стада свійських тварин. Найчастіше залишаються не з'ясованими питання генезису окремих видів, вихідні форми, що лягли в основу domestикації [2]. Прикладом є історія приручення коня, адже кінь відіграв центральну роль серед інших свійських тварин у розвитку людського суспільства. У дослідженні фауни ссавців плейстоцену – раннього голоцену Європи виникає проблема вивчення походження свійського коня *Equus caballus* L., тобто, встановлення диких предків одомашнених порід, місця, часу і процесу їх приручення. Аналіз літературних даних палеонтологічних та археологічних знахідок на території України показав, що більшість дослідників вважають, що вперше визнали прирученими тих коней, рештки яких знайдені під час археологічних розкопок поселення III тисячоліття до н. е. у Ботаї (Північний Казахстан), однак думки вчених щодо їх зоологічної класифікації розходяться. Одні вважають що це міг бути тарпан, проте існує думка, що великий за розмірами кінь не міг походити від малорослого тарпана і коня Пржевальського. Тому перевага була надана гіпотезі про походження свійського коня від давнього плейстоценового. Наразі проблема походження свійського коня не виходить за рамки гіпотез і здогадок [3] і перш за все це пов'язано з незначною відмінністю між кістками свійського та дикого коня. Пластичність скелету роду *Equus* дуже слабка і цим пояснюються проблеми, з якими зіштовхнулися палеонтологи при спробі розробити еволюційну історію коней. Отже, для розуміння процесів domestикації цієї тварини, окрім археологічних і палеонтологічних методів дослідження, необхідністю стає використання засобів інших галузей науки, таких як молекулярно-генетичний аналіз зразків ДНК [4]. Одним із варіантів тест-систем для вивчення генетичного поліморфізму є використання ISSR-маркерів, які надають змогу проаналізувати фрагменти ДНК і провести певні філогенетичні зв'язки у досліджених групах.

В лабораторії генетики Інституту розведення і генетики тварин імені М.В.Зубця НААН розпочато дослідження в області палеогенетики, а саме – вивчення молекулярно-генетичної складової у викопних рештках древніх представників роду *Equus* за допомогою ISSR-маркерів. Інвертовані повтори викликають особливу цікавість, оскільки вони нерівномірно розподілені по геному і не вимагають попереднього знання нуклеотидної послідовності піддослідної ДНК. Визначним моментом в підборі методики дослідження для нас було те, що міжмікросателітний поліморфізм використовується для дослідження міжвидової і внутрішньовидової генетичної мінливості. Вважається, що отримані при ISSR-аналізі фрагменти ДНК можуть бути видо- та породоспецифічними і цей метод широко застосовується дослідниками при вивченні породних груп [5, 6].

**Метою** нашої роботи є відпрацювання нової методики виділення ДНК із викопних решток (кісток) давніх коней та постановки ISSR-ПЛР з виділеними зразками ДНК в лабораторії генетики ІРГТ ім. М.В.Зубця НААН відповідно наявних реактивів та існуючих протоколів.

**Матеріали та методи досліджень.** Дослідження проводились на зразках викопних кісток коней плейстоценового періоду (близько 10 тис. р. до нашої ери). Одна кістка знайдена в с. Буки Житомирської обл. в кар'єрі. Розкопки здійснені у 1960 р., кістка п'ястку (*os. tarsicentral*) (Рис. 1). Інша кістка знайдена в Новгороді-Сіверському Чернігівської обл. в кар'єрі. Розкопки проводилися П. І. в 1935 р. Для дослідження дикого коня тарпана (4,5 тис. р. до н. е.) було використано зуб, знайдений в с. Скибниця Тростянецького району Вінницької області (Рис. 2). Розкопки проведені у 1959 році українським археологом, доктором історичних наук

В. М. Даниленком. Для дослідження палеонтологічний матеріал був наданий відділом палеонтології Київського національного науково-природничого музею НАН України.

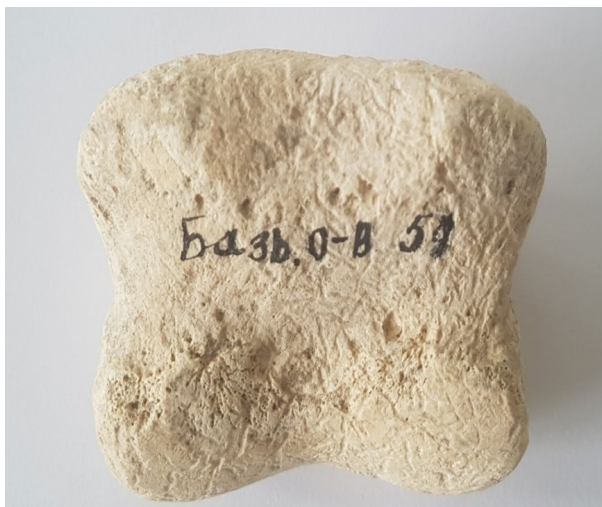


Рис. 1. Кістка коня плейстоценового періоду

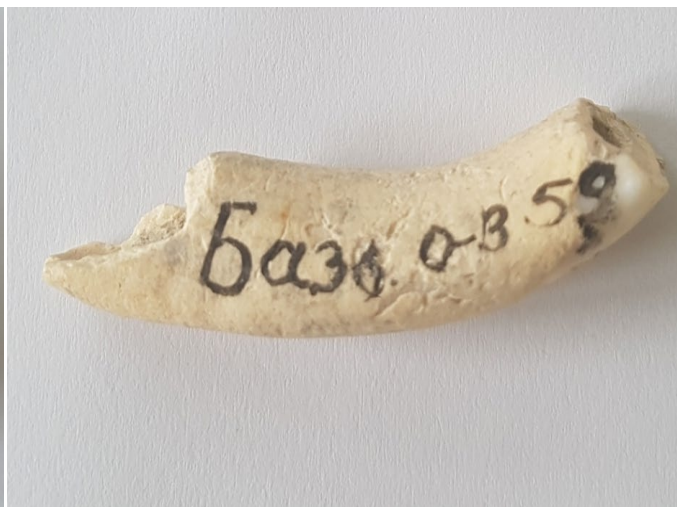


Рис. 2. зуб дикого коня тарпана

Найпоширенішою методикою отримання ДНК з кісткової тканини є тривала процедура підготовки проб, декальцифікації і очищення ДНК з використанням фенол-хлороформу. Висока токсичність деяких речовин, що використовуються при цьому, є суттєвим мінусом цього методу. Він досить трудомісткий, при цьому можливі значні втрати ДНК, залишкові забруднення протеїнами, фенолом і хлороформом – сильними інгібіторами ПЛР. В кінцевому підсумку в більшості випадків доводиться стикатися з проблемою нестабільності результату – результати або негативні, або такі які важко ідентифікувати [7].

З метою пошуку альтернативних методів виділення ДНК з кісток, в лабораторії генетики ІРГТ ім. М.В.Зубця, було використано модифіковану нами [8] методику на основі комерційного набору «ДНК Сорб-В», виробництва компанії «АмпліСенс».

**Результати досліджень.** Виділення ДНК із викопних кісток проводилося наступним чином:

1. Кістки ретельно механічно подрібнювалися – у ступці до стану кісткового борошна.
2. До кісткового борошна додавалися лізуючі речовини: лізуючий розчин з набору «ДНК Сорб-В», протеїназа К і ДТТ.
3. Суміш інкубувалася при температурі 56°C впродовж 72 годин.
4. Далі процес виділення відбувався згідно протоколу комерційного набору «ДНК Сорб-В».

Концентрацію ДНК в отриманому препараті визначали в агарозному гелі, шляхом порівняння яскравості полос фрагментів, які аналізуються і стандартного препарату ДНК (фрагменти фага  $\lambda$ ).

Для вивчення поліморфізму ДНК коней за ISSR-маркерами, проводили оптимізацію температурних режимів проведення ПЛР з чотирма приємами, що вважаються найбільш інформативними [9, 10] (табл. 1).

Суміш для проведення ПЛР у своєму складі містила: 1 мкл буфера для Tag-полімерази, 1 мкл суміші трифосфатів («Амплісенс», Росія), 0,8 мкл відповідного праймера, 0,2 мкл ДНК-полімерази («Fermentas», Литва), вода для ПЛР 3 мкл. Геномна ДНК додавалась у кількості 4 мкл. Загальний об'єм ДНК-суміші становив 10 мкл. Ампліфікацію проводили на програмованому чотирьох каналному термоциклі «Терцик» («ДНК-технологія», Росія). Програма ампліфікації включала первинну денатурацію (95°C, 2 хв); 30 циклів денатурації (95°C, 30 с), гібридизація праймерів (56–64°C, 30 с) та елонгація (72°C, 1 хв), фінішна елонгація (72°C, 5 хв).

### 1. Послідовності праймерів, які використовувалися у дослідженні

Назва олігонуклеотиду	Послідовність праймера	Мотив
GA-ISSR	5`-GAGAGAGAGAGAGAGAGAC-3`	(GA) <sub>9</sub> C
ACC-ISSR	5`-ACCACCACCACCACCACCG-3`	(ACC) <sub>6</sub> G
GAG-ISSR	5`-GAGGAGGAGGAGGAGGAGC-3`	(GAG) <sub>6</sub> C
AG-ISSR	5`-AGAGAGAGAGAGAGAGAGC-3`	(AG) <sub>9</sub> C

Продукти полімеразної ланцюгової реакції розділяли у 2% агарозному гелі в 1×TBE-буфері при напрузі 90 В (тривалість форефу 2 год). Візуалізацію проводили на транслюмінаторі в УФ-світлі при довжині хвилі 380 нм. Розміри отриманих продуктів ампліфікації визначали за допомогою маркера молекулярних мас ThermoScientific™ GeneRuler 1 kbPlusDNALadder, ready-to-use-75-20000 bp. Загалом, в результаті виконаної роботи ми отримали амплікони розміром від 300 до 2000 п. н. (рис. 3).

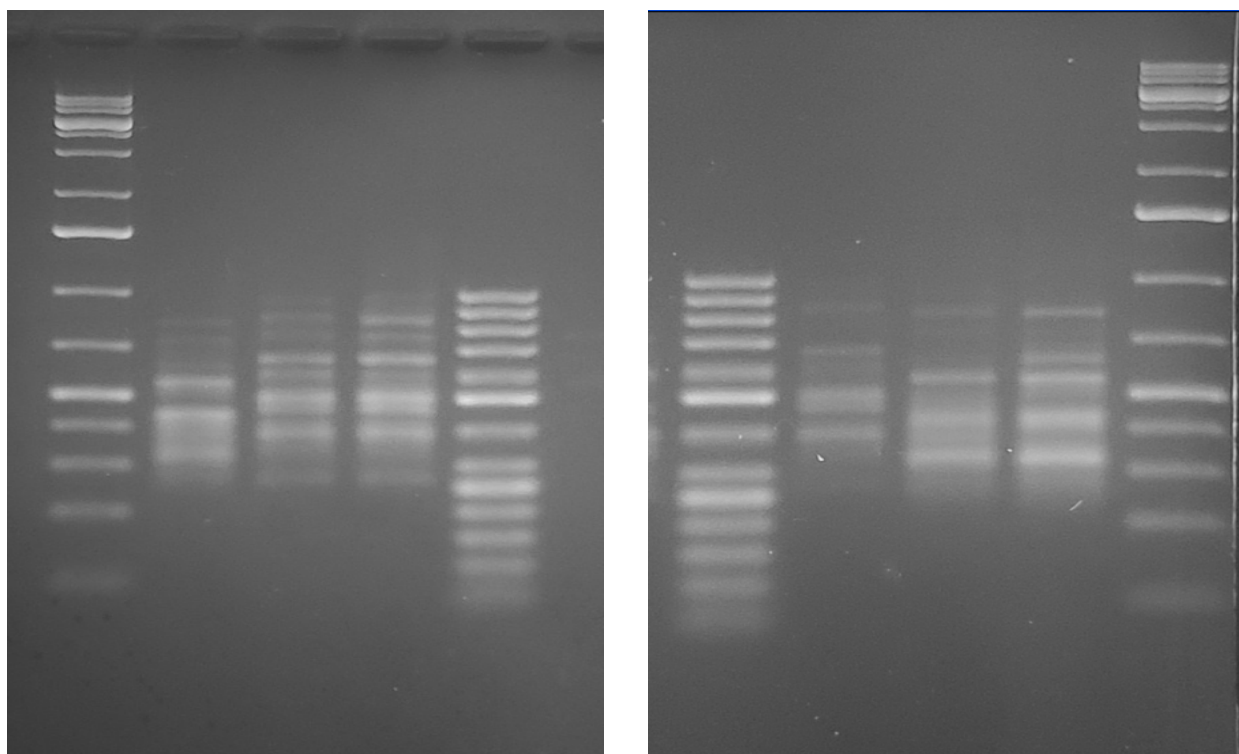


Рис. 3. Електрофореграми, отримані із використанням ДНК тарпана та плейстоценового коня

**Висновки.** 1. Вперше у відділі генетики та біотехнології ІРГТ ім. М.В.Зубця розпочаті дослідження з палеогенетики.

2. В результаті оптимізованої методики виділено ДНК із кісток коня плейстоценового періоду (близько 10 тис. р. до нашої ери) та зуба дикого коня тарпана (4,5 тис. р. до н. е.).

3. Підібрано оптимальні умови проведення ПЛР для роботи з ДНК, що була отримана із викопних решток, для вивчення поліморфізму за ISSR-маркерами та отримано електрофореграми продуктів ампліфікації.

Робота виконана за підтримки Міністерства освіти і науки України згідно договору № ДЗ/76-2019 від 03.09.2019 року.

### БІБЛІОГРАФІЯ

1. Ludovic Orlando, Aurélien Ginolhac, Guojie Zhang, Duane Froese, Anders Albrechtsen, Mathias Stiller, Mikkel Schubert, Enrico Cappellini, Bent Petersen, Ida Moltke, Philip L. F. Johnson, Matteo Fumagalli, Julia T., Vilstrup, Maanasa Raghavan, Thorfinn Korneliussen, Anna-Sapfo Malaspinas, Josef Vogt, Damian Szklarczyk, Christian D. Kelstrup, Jakob Vinther, Andrei Dolocan,

Jesper Stenderup, Amhed M. V. Velazquez, James Cahill, Morten Rasmussen, Xiaoli Wang, Jiumeng Min, Grant D. Zazula, Andaine Seguin-Orlando, Cecilie Mortensen, Kim Magnussen, John F. Thompson, Jacobo Weinstock, Kristian Gregersen, Knut H. Roed, Verra Eisenmann, Carl J. Rubin, Donald C. Miller, Douglas F. Antczak, Mads F. Bertelsen, Suren Brunak, Khaled A. S. Al-Rasheid, Oliver Ryder, Leif Andersson, John Mundy, Anders Krogh, M. Thomas P. Gilbert, Kurt Kjaer, Thomas Sicheritz-Ponten, Lars Juhl Jensen, Jesper V. Olsen, Michael Hofreiter, Rasmus Nielsen, Beth Shapiro, JunWang & Eske Willerslev. Recalibrating Equus evolution using the genome sequence of an early Middle Pleistocene horse. *Nature*. 2013. Vol. 499. 4 July. P. 74–78. DOI:10.1038/nature12323.

2. Бібікова В. І. До історії domestикації коня на південному сході Європи. *Археологія*. 1969. Вип. 22. С. 55–67.

3. Дригант Д. М. Таксономія та еволюція плейстоцен-голоценових коней на Передкарпатті і Волино-Поділлі. *Наукові записки Державного природознавчого музею*. Львів, 2016. Вип. 32. С. 171–194.

4. Курзенков М. Походження та domestикація коня у дослідженнях з молекулярної біології. *Історичні і політологічні дослідження*. 2018. № 2 (63). С. 11–30.

5. Грушецкая З. Е., Никитинская Т. В., Кубрак С. В., Дзюбан О. В., Кухарева Л. В., Титок В. В., Лемеш В. А., Парфенов В. И., Хотылева Л. В. Использование ISSR-анализа для изучения внутри- и межвидового генетического полиморфизма различных таксонов высших растений. *Вестник Брянского государственного университета*. Сер. 2. 2013. № 3. С. 50–56.

6. Rania A. Tahseen, Karam A. Amein, Dalia H. Samak, Yasser S. El-Sayed, Sherif M. Nasr. Verifying parentage and genetic variability among Arabian horse using ISSR markers. *Alexandria Journal of Veterinary Sciences*. 2018. Vol. 59, is. 1. P. 125–33. DOI:10.5455/ajvs.7699.

7. Червоная Г. В., Хайдаршин С. Г. К вопросу о выделении геномной днк из содержимого костного канала фрагментов трубчатых костей. *Актуальные вопросы судебной медицины и экспертной практики*. Барнаул-Новосибирск, 2011. Вып. 17. URL: <http://journal.forens-lit.ru/node/494> (дата звернення 06.08.2020).

8. Мохначова Н. Б. Оптимізація методу постановки 2-х етапної ПЛР для вивчення поліморфізму гена BoLA-DRB 3, як маркера оцінки генетичної різноманітності ВРХ. *Селекційні, генетичні та біотехнологічні методи збереження, поліпшення і використання генофонду тварин*: матеріали XV Всеукр. наук. конф. молодих вчених та аспірантів присвяч. 15-річчю присвоєння статусу національного надбаня Банку генетичних ресурсів тварин Інституту розведення і генетики тварин імені М.В.Зубця. Чубинське, 2017. С. 29–30.

9. Донт Ю. У., Тимарова А. В., Комарова Л. В., Бороникова С. В. Генетический полиморфизм трех пород лошади домашней. *Вестник Пермского университета*. 2018. Вып. 1. С. 50–56.

10. Копилова К., Добрянська М, Вороненко В., Назаренко В. Генетична структура популяції сірої української породи великої рогатої худоби за двома типами ДНК-маркерів. *Таврійський науковий вісник*. 2012. Вип. 78. Ч. 2 (I). С. 263–267.

## REFERENCES

1. Ludovic Orlando, Auerliien Ginolhac, Guojie Zhang, Duane Froese, Anders Albrechtsen, Mathias Stiller, Mikkel Schubert, Enrico Cappellini, Bent Petersen, Ida Moltke, Philip L. F. Johnson, Matteo Fumagalli, Julia T. Vilstrup, Maanasa Raghavan, Thorfinn Korneliusen, Anna-Sapfo Malaspinas, Josef Vogt, Damian Szklarczyk, Christian D. Kelstrup, Jakob Vinther, Andrei Dolocan, Jesper Stenderup, Amhed M. V. Velazquez, James Cahill, Morten Rasmussen, Xiaoli Wang, Jiumeng Min, Grant D. Zazula, Andaine Seguin-Orlando, Cecilie Mortensen, Kim Magnussen, John F. Thompson, Jacobo Weinstock, Kristian Gregersen, Knut H. Roed, Verra Eisenmann, Carl J. Rubin, Donald C. Miller, Douglas F. Antczak, Mads F. Bertelsen, Suren Brunak, Khaled A. S. Al-Rasheid, Oliver Ryder, Leif Andersson, John Mundy, Anders Krogh, M. Thomas P. Gilbert, Kurt

Kjaer, Thomas Sicheritz-Ponten, Lars Juhl Jensen, Jesper V. Olsen, Michael Hofreiter, Rasmus Nielsen, Beth Shapiro, JunWang, and Eske Willerslev. 2013. Recalibrating Equus evolution using the genome sequence of an early Middle Pleistocene horse. *Nature*. 499(7456):74–8. DOI: 10.1038/nature12323 (in English).

2. Bibikova, V. I. 1969. Do istoriyi domestykatsiyi konya na pivdenomu skhodi Yevropy – To the history of horse domestication in southeastern Europe. *Arkheolohiya – Archeology*. 22:55–67 (in Ukrainian).

3. Dryhant, D. M. 2016. Taksonomiya ta evolyutsiya pleystotsen-holotsenovykh koney na Peredkarpatti i Volyno-Podilli – Taxonomy and evolution of Pleistocene-Holocene horses in the Pre-carpathians and Volyn-Podillya. *Naukovi zapysky Derzhavnoho pryrodoznavchoho muzeyu – Scientific notes of the State Museum of Natural History*. L'viv, 32:171–194 (in Ukrainian).

4. Kurzenkov, M. 2018. Pokhodzhennya ta domestykatsiya konya u doslidzhennyakh z molekulyarnoyi biolohiyi – The origin and domestication of the horse in molecular biology research. *Istorychni i politolohichni doslidzhennya – Historical and political science research*. 2(63):11–30 (in Ukrainian).

5. Grusheckaja, Z. E., T. V. Nikitinskaja, S. V. Kubrak, O. V. Dzjuban, L. V. Kuhareva, V. V. Titok, V. A. Lemesh, V. I. Parfenov, and L. V. Hotyleva. 2013. Ispol'zovanie ISSR-analiza dlja izuchenija vnutri- i mezhvidovogo geneticheskogo polimorfizma razlichnykh taksonov vysshih rastenij – Use of ISSR analysis to study intra- and interspecific genetic polymorphism of various taxa of higher plants. *Vestnik Brjanskogo gosudarstvennogo universiteta – Bryansk state university bulletin*. 2(3):50–56 (in Russian).

6. Rania, A. Tahseen, Karam A. Amein, Dalia H. Samak, Yasser S. El-Sayed, and Sherif M. Nasr. 2018. Verifying parentage and genetic variability among Arabian horse using ISSR markers. *Alexandria Journal of Veterinary Sciences*. 59(1):125–133 DOI:10.5455/ajvs.7699 (in English).

7. Chervonaja, G. V., and S. G. Hajdarshin. 2011. K voprosu o vydelenii genomnoj dnk iz sodержimogo kostnogo kanala fragmentov trubchatykh kostej – On the issue of genomic dna isolation from the content of the bone canal of tubular bone fragments. *Aktual'nye voprosy sudebnoj mediciny i jekspertnoj praktiki. Barnaul-Novosibirsk – Topical issues of forensic medicine and expert practice. Barnaul-Novosibirsk*. 17 URL: <http://journal.forens-lit.ru/node/494> (in Russian).

8. Moknachova, N. B. 2017. Optyimizaciya metodu postanovky 2-x etapnoyi PLR dlja vyvchennya polimorfizmu gena BoLA-DRB 3, yak markera ocinky genetychnoyi riznomanitnosti VRX – Optimization of the method of setting 2-stage PCR to study the polymorphism of the BoLA-DRB 3 gene as a marker for assessing the genetic diversity of cattle. *Materialy XV Vseukr. nauk. konf. molody`x vcheny`x ta aspirantiv pry`svyachenoyi pam'yati akademika UAAN Valeriya Petrovy`cha Burkata – Materials XV All-Ukrainian. Science. conf. young scientists and graduate students dedicated to the memory of Academician of UAAS Valery Petrovich Burkat*. Chubynske. 29–30 (in Ukrainian).

9. Dont Ju, U., A. V. Timarova, L. V. Komarova, and S. V. Boronnikova. 2018. Geneticheskij polimorfizm treh porod loshadi domashnej – Genetic polymorphism of three breeds of the domestic horse *Vestnik Permskogo universiteta – Perm university bulletin*. 1:50–66. DOI:10.17072/1994-9952-2018-1-50-56 (in Russian).

10. Kopylova, K. V., M. L. Dobryans'ka, V. I. Voronenko, and V. G. Nazarenko. 2012. Henetychna struktura populyatsiyi siroyi ukrayins'koyi porody velykoyi rohatoyi khudoby za dvoma typamy DNK-markeriv – Genetic structure of the population of the gray Ukrainian breed of cattle by two types of DNA markers. *Tavriys'kyi naukovyy visnyk – Taurian Scientific Bulletin*. 78(2–1):263–267 (in Ukrainian).