




БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА БІОІНЖЕНЕРІЯ

УДК 575:597.442

Порівняльний аналіз методів виділення ДНК із різних тканин риб

Димань Т.М.¹ , Шостак Л.В.², Дубін О.В.¹, Димань Н.О.¹ ¹ Білоцерківський національний аграрний університет² Компанія «Syngenta» Димань Т.М. E-mail: tetyanadyman@gmail.com

Димань Т.М., Шостак Л.В., Дубін О.В., Димань Н.О. Порівняльний аналіз методів виділення ДНК із різних тканин риб. Збірник наукових праць «Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва», 2023. № 1. С. 97–104.

Dyman T.M., Shostak L.V., Dubin O.V., Dyman N.O. A comparative analysis of different DNA extraction methods for fish tissues. «Animal Husbandry Products Production and Processing», 2023. № 1. PP. 97–104.

Рукопис отримано: 05.05.2023 р.

Прийнято: 19.05.2023 р.

Затверджено до друку: 25.05.2023 р.

doi: 10.33245/2310-9289-2023-178-1-97-104

Екстракція нуклеїнових кислот є початковим етапом молекулярно-генетичних досліджень. Ефективність застосування певної методики виділення ДНК визначається кількістю екстрагованої ДНК, ступенем деградації препарату, загальною тривалістю та трудомісткістю процедури. Під час досліджень рідкісних зникаючих видів і популяцій особливу увагу приділяють виділенню ДНК із джерел, які не спричиняють руйнувань чи загибелі організму. Метою дослідження було порівняння ефективності найбільш поширених методів виділення геномної ДНК із тканин риб для подальшого використання в полімеразній ланцюговій реакції – методу фенол-хлороформної екстракції, методу сольової екстракції та методу екстракції з перхлоратом натрію. Матеріалом для досліджень слугували зафіксовані в етанолі проби плавців, печінки та ікри, відібрані у особин стерляді. Дослідження впливу якості препарату ДНК на перебіг ПЛР проводили за використання двох видів ПЛР – сайт-специфічної, ампліфікуючи фрагмент гена *cytochrome-b*, та мультилокусної – ISSR-PCR з три-нуклеотидним праймером (AGC)₆T. Порівняння методик екстракції ДНК підтвердило, що всі вони уможливають отримання якісних препаратів ДНК як із свіжих, так і з архівних проб тканин риб для проведення сайт-специфічної ампліфікації. Вихід нуклеїнових кислот за використання різних тканин риб (плавців, печінки та ікри) неоднаковий, тому, коли необхідно отримати максимальну кількість ДНК, доцільно застосовувати методику сольової екстракції. У випадку мультилокусної ампліфікації, зокрема ISSR-PCR, різний ступінь очищення ДНК впливав на перебіг процесу ампліфікації. Додаткове очищення методом сорбції на силіцій оксиді дає змогу позбутися можливих інгібіторів ПЛР і отримати чіткі спектри електрофоретичного розділення продуктів ампліфікації, незважаючи на якість первинного препарату ДНК.

Ключові слова: методи виділення ДНК, плавці, печінка, ікра стерляді, сайт-специфічна ПЛР, мультилокусна ПЛР.

Постановка проблеми та аналіз останніх досліджень. Екстракція нуклеїнових кислот є початковим етапом молекулярно-генетичних досліджень. Для успішного виділення очищеної та значної кількості ДНК важливу роль відіграють принцип та методи виділення. Нині використовують різні методи виділення ДНК залежно від мети подальшого використання нуклеїнових кислот – ампліфікація окремих геномних локусів, блот-гібридизація, клонування, синтез ДНК та ін. Оцінюючи ефективність застосування пев-

ної методики, зазвичай враховують такі критерії: кількість екстрагованої ДНК, ступінь деградації препарату, загальна тривалість та трудомісткість процедури. Крім того, необхідно брати до уваги термін подальшого зберігання препаратів ДНК, на який суттєво впливає присутність ДНК-нуклеаз. Універсального протоколу, який відповідав би усім зазначеним критеріям, не існує, тому під час роботи з різним біологічним матеріалом вибір методики виділення ДНК проводиться індивідуально [8, 9].

Ступінь виділення і чистота ДНК залежать від низки чинників, серед яких – розміри зразків біологічного матеріалу, методи їх відбору та зберігання. Особливу увагу останнім часом приділяють виділенню ДНК із джерел, які не спричиняють руйнувань чи загибелі організму. Такі методи надзвичайно важливі під час досліджень рідкісних, зникаючих видів і популяцій. ДНК екстрагують із яєчної шкаралупи, фекалій, злущеної шкіри китів і змій, сечі, пір'я, волосся і кісток у фекальних гранулах м'ясоїдних тварин та ін. На жаль, ДНК у таких зразках обмаль, тому для індивідуальної ідентифікації зазначені джерела майже не використовують. Тим часом кров, м'язи, шкіра, плавці, луска можуть бути успішно використані для виділення великої кількості якісної ДНК без будь-якої потенційної шкоди для тварин [14].

У випадку генетичного аналізу риб (вивчення між- та внутрішньопопуляційного поліморфізму, реконструкції родоводу, оцінювання спорідненості) ДНК найчастіше виділяють із плавців, які відбирають зажиттєво. Якщо проводиться повний біологічний аналіз, для виділення ДНК використовують м'язи або частини органів риб. Для видової ідентифікації та аналізу походження зразків риб і продуктів їх переробки часто ДНК виділяють із ікри [12].

Препарат ДНК можна виділяти як із свіжих зразків, так і з тканин риб, які тривалий час зберігалися в генетичних колекціях за низьких температур після відповідної процедури фіксації. Більшість природничих музеїв зберігають експонати у рідких консервантах, таких як формалін, етанол, ізопропанол. За тривалого зберігання у формаліні перебігають різноманітні хімічні реакції, що призводить до руйнування високомолекулярних нуклеїнових кислот та накопичення продуктів розпаду тканин. Тому виділення ДНК із колекційних зразків риб має певні специфічні особливості [3].

Для одержання високополімерного препарату ДНК потрібно, по-перше, інгібувати нуклеази, які вивільняються у процесі руйнування клітин. Для зниження їх активності екстрагування проводять у неоптимальному для нуклеаз лужному середовищі. З метою лізису клітинних мембран, збільшення виходу і поліпшення депротейнізації ДНК до буферу вводять додецилсульфат натрію. Для ефективного лізису зразків – протеолітичні ферменти, які не втрачають активності за підвищених температур. Особливо популярною є протеїназа К, яка має широкий спектр субстратної специфічності [11].

Найбільш використовуваними методиками, що застосовуються для виділення ДНК зі зраз-

ків риб, є фенол-хлороформна екстракція [1], сольова екстракція [2] та екстракція з перхлоратом натрію [17]. Кожна з цих методик має певні особливості, які пов'язані зі специфікою депротейнізації, осадженням ДНК та часом, необхідним на проведення процедури виділення. Особливо це має важливе значення у випадку одночасного аналізу багатьох зразків. Важливу роль у виборі тієї чи іншої методики відіграє також вартість хімічних реагентів та витратних матеріалів.

Мета дослідження – порівняння ефективності найбільш поширених методів виділення тотальної ДНК із тканин риб для подальшого використання в полімеразній ланцюговій реакції (ПЛР).

Матеріал і методи дослідження. Матеріалом для досліджень слугували зафіксовані в етанолі проби плавців, печінки та ікри, відібрані в особин стерляді, виловленої у верхній частині Канівського водосховища під час любительського рибальства. У польових умовах проби заливали 96 % етанолом. Для виділення геномної ДНК тканини відмивали у дистильованій воді, підсушували і відрізали по 200 мг.

У роботі тестували такі методи виділення ДНК: фенол-хлороформна екстракція, сольова екстракція, екстракція з перхлоратом натрію (NaClO_4). Додаткове очищення препаратів ДНК проводили методом сорбції на силіцій оксиді [5]. Концентрацію ДНК визначали за допомогою спектрофотометра СФ-101. Ступінь її депротейнізації визначали за співвідношенням A_{260}/A_{280} (ДНК має максимальне поглинання приблизно за довжини хвилі 260 нм, а білки – 280 нм). Зразок ДНК вважають чистим, якщо це співвідношення становить від 1,8 до 2,0 [6, 13].

Дослідження впливу якості препарату ДНК на перебіг ПЛР проводили за схемою, наведеною у таблиці 1. Використовували два види ПЛР – сайт-специфічну, ампліфікуючи фрагмент розміром 654 п. н. гена *cytochrome-b*, та мультилокусну – за використання тринуклеотидного праймера $(\text{AGC})_6\text{T}$. Ці види ПЛР широко використовують для видової ідентифікації [14].

Електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації проводили у 2 % агарозному гелі за використання $1\times\text{TBE}$ -буферу. Після закінчення електрофорезу гель обробляли бромистим етидієм (0,5 мкг/л) та візуалізували в УФ-світлі за допомогою відеосистеми *GelDoc XR System (BioRad)*. Молекулярну масу ПЛР-продуктів визначали за маркером *GeneRuler 100 bp (Fermentas)*.

Таблиця 1 – Схема дослідження впливу якості препарату ДНК на перебіг ПЛР.

| Показник | Вид ПЛР | |
|------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | Сайт-специфічна (фрагмент гена цитохрому b 654 п.н.) | Мультилокусна (ISSR-PCR) |
| Праймери | <i>cytF</i> GCAATACACTACACAGCTGACA <i>cytR</i> GCTTGATGTGTGGGGGAGT | (AGC) ₆ T |
| Об'єм реакційної суміші, мкл | 20 | 20 |
| Склад реакційної суміші | 67 мМ Tris-HCl (pH 8,8), 17 мМ (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,01 % Tween-20, 0,2 мМ dNTP, 1 од. <i>Taq</i> -полімерази, 50 нг геномної ДНК, 2,0 мМ MgCl ₂ , по 0,2 мкМ кожного праймера | 67 мМ Tris-HCl (pH 8,8), 17 мМ (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,01 % Tween-20, 0,2 мМ dNTP, 1 од. <i>Taq</i> -полімерази, 50 нг геномної ДНК, 2,0 мМ MgCl ₂ , 0,4 мкМ праймера |
| Протокол ПЛР | початкова денатурація – 4 хв за 94 °C; 32 цикли: 30 с за 94 ° | початкова денатурація – 4 хв за 94 ° |

Результати дослідження та обговорення.

Фенол-хлороформна екстракція. За цією методикою біологічні зразки лізують у відповідному буфері, а потім проводять депротейнізацію одержаного лізату фенолом, або сумішшю хлороформ: фенол: ізоаміловий спирт (1:1:24). Метод має низку суттєвих недоліків, зокрема руйнування високополімерних молекул ДНК на фрагменти під час механічного перемішування. Крім того, фенол вибірково екстрагує сателітну ДНК АТ-типу, спричинює збільшення втрати ДНК, на 10 % знижує густину ДНК. Хлороформ може вибірково екстрагувати одноланцюгову ДНК (приблизно 54 % упродовж трьох обробок) [4]. Під час депротейнізації розчином для лізису з хлороформом білок утворює гель на поверхні розподілу хлороформ – вода, тимчасом як натрієва сіль ДНК залишається у водній фазі.

Узагальнені результати порівняння концентрацій та якості депротейнізації препаратів ДНК стерляді, отриманих за використання фенол-хлороформної екстракції, представлено в таблиці 2.

Таблиця 2 – Характеристика препаратів ДНК, виділених за використання методу фенол-хлороформної екстракції.

| Тканина | Концентрація ДНК, мг/мл | Ступінь депротейнізації ДНК A_{260}/A_{280} |
|---------|-------------------------|--------------------------------------------------|
| Плавці | 0,31±0,048 | 1,9 |
| Печінка | 0,46±0,038 | 1,8 |
| Ікра | 0,13±0,023 | 1,8 |

За умови однакової початкової кількості зразка (200 мг) найбільшу кількість ДНК одержували із печінки риб – 0,46 мг/мл, найменшу – із ікри – 0,13 мг/мл. Із плавців отримували в середньому 0,31 мг/мл препарату тотальної ДНК. Відмінності концентрацій ДНК, виділеної із різних тканин риб, спостерігали й під час електрофоретичного розділення її препарату (рис. 1).

Загалом метод виявився трудомістким й потребував приблизно 6 годин для виділення препарату ДНК із одного зразка. Разом з тим, за використання фенол-хлороформного методу виділення нуклеїнової кислоти, розчини препаратів ДНК виявились добре очищеними від домішок білка, про що свідчать результати порівняння оптичної густини за A_{260nm} та A_{280nm} .

Виділення ДНК за використання методу сольової екстракції. Первинний лізис зразків тканин стерляді, як і в попередньому випадку, проводили за використання протеолітичного ферменту протеїнази К. Проби струшували на вортексі й контролювали ефективність лізису тканин візуально через кожні 30 хв. У випадку сповільненого лізису концентрацію протеолітичного ферменту збільшували вдвічі без зміни загального об'єму буферу для лізису. Переважна більшість зразків потребувала 1,5–2 год для повного розчинення тканин.

Окремі проби, що зазвичай містили щільні тканини, не розчинялися навіть за високої концентрації ферменту. У таких випадках їх залишали в термостаті за температури 57 °C на ніч і проводили процедуру виділення ДНК вранці наступного дня. Денатурацію білків проводили додаванням високої концентрації

ції NaCl. За таких умов білки осаджували центрифугуванням за 10 000 об/хв упродовж 30 хв. Супернатант переносили у чисті пробірки і осаджували ДНК таким самим об'ємом ізопропілового спирту. Осад промивали 70 % етанолом, висушували та розчиняли у ТЕ-буфері.

У таблиці 3 наведено результати порівняння концентрацій та якості депротейнізації препаратів ДНК стерляді, отриманих за використання методу сольової екстракції. Як і у випадку фенол-хлороформної екстракції, найбільшу кількість ДНК одержували із печінки риб – 0,68 мг/мл, найменшу – із ікри – 0,21 мг/мл. Із плавців риб отримували в середньому 0,38 мг/мл препарату тотальної ДНК. Зображення електрофоретичного розділення препаратів ДНК із різних тканин риб підтверджує дані, отримані за допомогою спектрофотометричного дослідження (рис. 2).

Таблиця 3 – Характеристика препаратів ДНК, виділених за використання сольової екстракції.

| Тканина | Концентрація ДНК, мг/мл | Ступінь депротейнізації ДНК A_{260}/A_{280} |
|---------|-------------------------|-----------------------------------------------|
| Плавці | 0,38±0,035 | 2,1 |
| Печінка | 0,68±0,053 | 1,6 |
| Ікра | 0,21±0,046 | 1,9 |

Як свідчать результати порівняння оптичної густини за A_{260nm} та A_{280nm} , розчини препаратів ДНК містили домішки білків, найбільшу кількість яких спостерігали під час виділення ДНК із печінки риб. Процедура виділення ДНК тривала значно менше часу, ніж для попереднього методу – в середньому 3 год на один зразок.

Метод екстракції з перхлоратом натрію. Первинний лізис зразків тканин стерляді проводили так, як у попередніх випадках. Денатурацію білків проводили додаванням перхлорату натрію та хлороформу. ДНК за цим методом осаджували етиловим спиртом. Осад промивали 70 % етанолом, висушували та розчиняли у ТЕ-буфері. Результати порівняння концентрацій препаратів ДНК та якості їх депротейнізації за використання методу екстракції з перхлоратом натрію представлено в таблиці 4, зображення електрофоретичного розділення препаратів тотальної ДНК стерляді – на рисунку 3.

Таблиця 4 – Характеристика препаратів ДНК, виділених за використання екстракції з перхлоратом натрію.

| Тканина | Концентрація ДНК, мг/мл | Ступінь депротейнізації ДНК A_{260}/A_{280} |
|---------|-------------------------|-----------------------------------------------|
| Плавці | 0,34±0,018 | 2,0 |
| Печінка | 0,58±0,023 | 1,8 |
| Ікра | 0,16±0,021 | 1,9 |

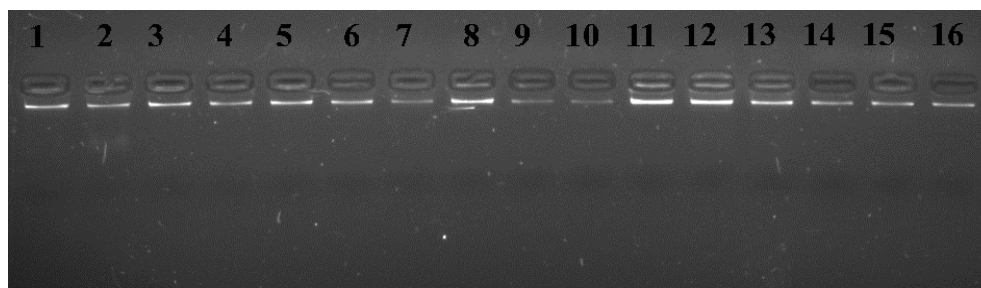


Рис. 1. Електрофореграма препаратів тотальної ДНК, виділених за використання методу фенол-хлороформної екстракції: 1–5 – із плавців, 6–10 – із ікри, 11–16 – із печінки риб.

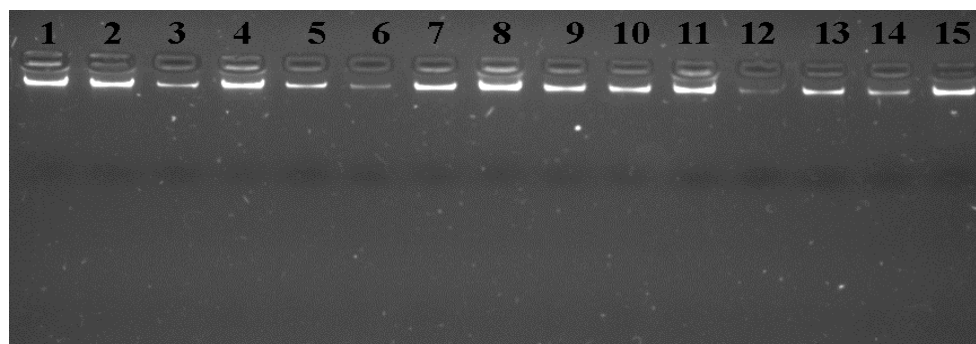


Рис. 2. Електрофореграма препаратів тотальної ДНК, виділених за використання методу сольової екстракції: 1–5 – із плавців, 6–11 – із печінки риб, 12–15 – із ікри.

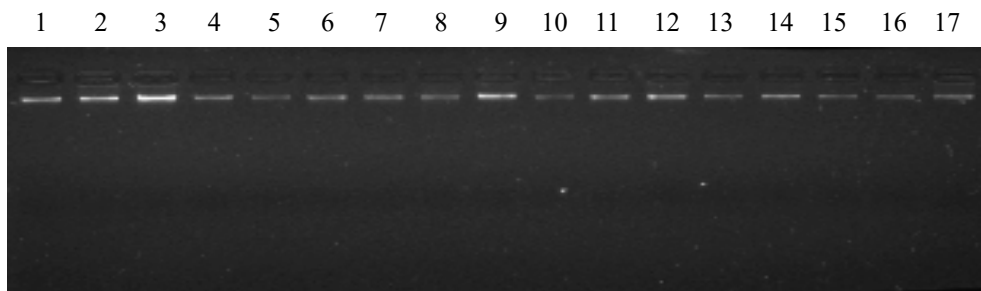


Рис. 3. Електрофореграма препаратів тотальної ДНК, виділених за використання методу сольової екстракції: 1–8 – із плавців, 9–13 – із печінки риб, 14–17 – із ікри.

Як і в попередніх методах, найбільшу кількість ДНК одержували із печінки риб – 0,58 мг/мл, найменшу – із ікри – 0,16 мг/мл. Із плавців стерляді отримували в середньому 0,34 мг/мл препарату тотальної ДНК.

За наявністю домішок білка у виділених препаратах ДНК метод займав проміжну позицію між фенол-хлороформною та сольовою екстракціями. Процедура виділення тривала 2,5 год для одного зразка.

Виділення препарату ДНК високої якості необхідно для більшості молекулярно-біологічних маніпуляцій. Невелика кількість ДНК і присутність інгібіторів ПЛР, наявність яких у препараті часто неможливо визначити звичайними аналітичними методами, призводять до некоректної інтерпретації результатів ПЛР. Білки, РНК, ліпіди та полісахариди, які залишаються у препаратах ДНК, виділених за загальноприйнятими методиками, можуть зни-

жувати активність ДНК-полімерази практично до повного її інгібування.

Як зазначалось вище, перевірку якості препаратів тотальної ДНК (присутність інгібіторів ферменту *Tag*-полімерази), виділених із різних тканин риб, проводили за використання сайт-специфічної ампліфікації мітохондріального *cytochrome-b* гена та методу мультилокусного ДНК-профілювання – ISSR-PCR.

На рисунку 4 представлено результати ПЛР з універсальними праймерами до консервативної ділянки гена *cytochrome-b*. Продукти ПЛР не різнилися за інтенсивністю свічення в ультрафіолетовому світлі й мали однакову молекулярну масу. Отримані результати підтверджують, що методика виділення ДНК не впливає на перебіг сайт-специфічної ампліфікації, тобто розчини ДНК достатньо очищені від можливих інгібіторів, незалежно від тканини, з якої проводили виділення.

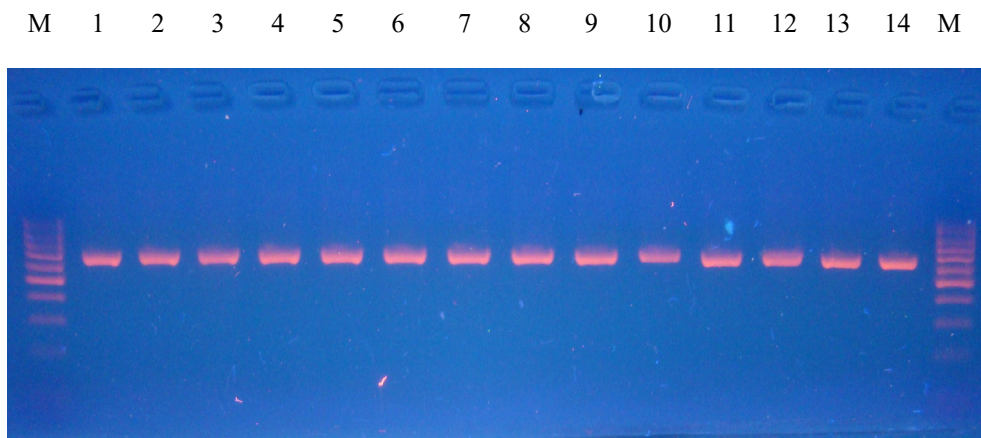


Рис. 4. Електрофоретичне розділення ПЛР-продуктів гена *cytochrome-b* із ДНК стерляді, виділеної за використання різних методів: 1–5 – фенол-хлороформної екстракції; 6–10 – сольової екстракції; 11–14 – екстракції з перхлоратом натрію; 1, 2, 6, 7, 11, 12 – плавці; 3, 4, 8, 9, 13 – печінка; 5, 10, 14 – ікра; М – молекулярний маркер (п. н.).

Для перевірки присутності ДНК-нуклеаз у препаратах ДНК сайт-специфічну ампліфікацію гена *cytochrome-b* повторювали через 3 місяці. При цьому одну частину препаратів ДНК зберігали у морозильній камері за температури мінус 20 °С, а іншу – за кімнатної температури на робочому столі. У результаті порівняння електрофореграм продуктів ампліфікації було з'ясовано, що ампліфікати аналогічні за молекулярною масою та концентрацією. Слідів деградації препарату високомолекулярної ДНК виявлено не було.

Рисунок 5 ілюструє вплив якості препарату ДНК на перебіг мультилокусної ампліфікації ISSR-PCR. За ампліфікації препаратів ДНК, виділених трьома методами, було виявлено відмінності в якісному та кількісному складі отриманих спектрів за використання одного і того самого зразка. Причиною цього, на нашу думку, був різний ступінь чистоти препаратів ДНК, який вплинув на термодинамічні показники випалювання праймерів, відтак, зумовив відмінності за кількістю ПЛР-локусів.

Для стандартизації етапу виділення ДНК було застосовано метод її сорбції на силіцій оксиді, який добре зарекомендував себе під час роботи з рослинними зразками та кров'ю тварин. Суть методу полягає в тому, що високомолекулярна ДНК здатна зв'язуватися з діоксидом кремнію в присутності хаотропних хімічних спо-

лук, таких, зокрема, як гуанідин тіоціанат. Цей принцип широко використовують у комерційних наборах для виділення ДНК з метою отримання високоякісних препаратів нуклеїнових кислот у молекулярно-біологічних дослідженнях.

Додаткове очищення препаратів ДНК, виділених за різними протоколами, дало змогу позбутися можливих інгібіторів і отримати чіткі спектри ампліфікації (рис. 6).

Висновки. Порівняння найпоширеніших методик екстракції ДНК із різних тканин риб підтвердило, що методи фенол-хлороформної екстракції, сольової екстракції, екстракції з перхлоратом натрію уможливають отримання якісних препаратів ДНК як із свіжих, так із архівних проб тканин риб для проведення сайт-специфічної ампліфікації. За достатньої якості препаратів ДНК вихід нуклеїнових кислот за використання різних тканин риб (плавців, печінки та ікри) неоднаковий, тому, коли необхідно отримати максимальну кількість ДНК, доцільно застосовувати методику сольової екстракції.

У випадку мультилокусної ампліфікації, зокрема ISSR-PCR, різний ступінь очищення ДНК впливав на перебіг процесу ампліфікації. Додаткове очищення методом сорбції на силіцій оксиді дало змогу позбутися можливих інгібіторів ПЛР і отримати однакові спектри, незважаючи на якість первинного препарату ДНК.

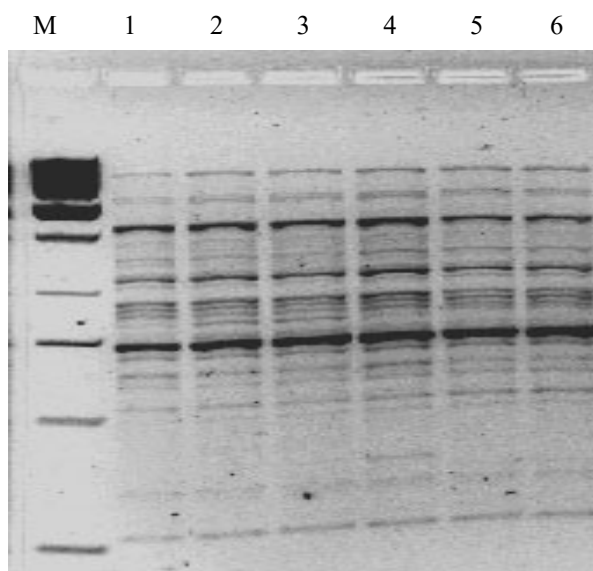


Рис. 5. ISSR-спектри ДНК стерляді, виділеної за різними методиками: 1, 2 – метод фенол-хлороформної екстракції; 3, 4 – сольової екстракції; 5, 6 – екстракція з перхлоратом натрію; М – молекулярний маркер (п. н.). Стрілкою вказано продукти ампліфікації, які різняться у зразків.

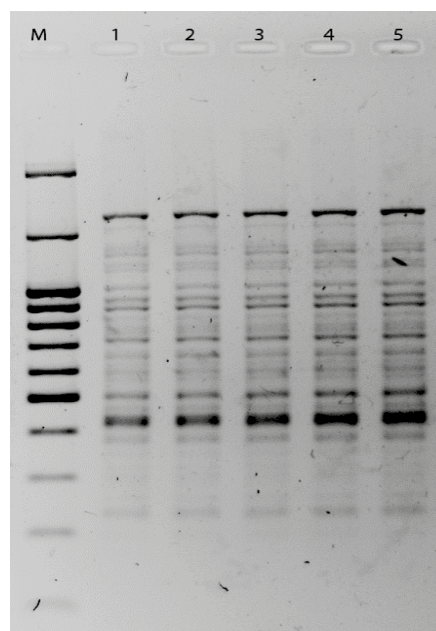


Рис. 6. ISSR-PCR-спектри ДНК риб після додаткового очищення методом сорбції на силіцій оксиді: М – молекулярний маркер (п. н.); 1–5 – досліджені зразки тканин.

REFERENCES

- Aljanabi, S. M., Martinez, I. (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Res.*, Vol. 25, no. 22, pp. 4692–4693.
- Amos, B., Hoelzel, A. R. (1991). Longterm preservation of whale skin for DNA analysis. *Rep. int. Whal. Commn. (special issue)*, no. 13, pp. 99–103.
- Appleyard, Sh.F., Maher, S., Pogonoski, J.J., Bent, S.L., Chua, X-Y., McGrath, F. (2021). Assessing DNA for fish identifications from reference collections: the good, bad and ugly shed light on formalin fixation and sequencing approaches. *Fish biology*, Vol. 98, no.5, pp. 1421–1432.
- Barbosa, C., Nogueira, S., Gadanho, M., Chaves, S. (2016). DNA extraction: finding the most suitable method. *Molecular Microbial Diagnostic Methods: Pathways to Implementation for the Food and Water Industries. Chapter 7. Elsevier Inc.*, pp. 135–154.
- Boom, R., Sol, C., Weel, J., Goudsmit, J., Wertheim-van Dillen, P. (1999). Improved Silica-Guanidiniumthiocyanate DNA Isolation Procedure Based on Selective Binding of Bovine Alpha-Casein to Silica Particles. *J. Clin Microbiol.*, Vol. 37, no. 3, pp. 615–619. DOI:10.1128/jcm.37.3.615-619.1999.
- Brescia, P. (2012). Micro-Volume Purity Assessment of nucleic acids using A260/A280 ratio and spectral scanning. Application Note: protein and nucleic acid quantification. AN060112_12, Rev. 06/04/12. BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT. Retrieved from <http://www.biotek.com>.
- Bruyn, M. D., Parenti, L. R., Carvalho, G. R. (2011). Successful extraction of DNA from archived alcohol-fixed white-eye fish specimens using an ancient DNA protocol. *J. Fish Biol.*, Vol. 78, pp. 2074–2079.
- Chowdhury, M. M., Rahman, A. S. M. S., Nahar, L., Rahman, M., Al Reza, H., Ahmed, M. S. (2016). Efficiency of different DNA extraction methods for fish tissues: A comparative analysis. *IOSR Journal of Pharmacy & Biologocal Science*, Vol. 11, no. 3, pp. 11–15. DOI:10.9790/3008-1103041115.
- Dwiyitno Hoffman, S., Parmentier, K., Van Keer, C. (2018). Method Comparison of DNA Isolation and Quantification for Fish and Seafood Authenticity Determination. *Squalen Bull. of Mar. and Fish. Postharvest and Biotech.*, Vol. 13, no. 3, pp. 115–124.
- Fang, S., Wan, Q., Fujihara, N. (2002). Formalin removal from archival tissue by critical point drying. *Biotechnology*, Vol. 33, pp. 604–611.
- Hilz, H., Wieggers, U., Adamietz, P. (1975). Stimulation of proteinase K action by denaturing agents: application to the isolation of nucleic acids and the degradation of 'masked' proteins. *FEBS Journal*, Vol. 56, no. 1. pp. 103–108. DOI:10.1111/j.1432-1033.1975.tb02211.x.
- Kumar, R., Singh, P. J., Nagpure N. S., Kushwaha, B., Srivastava, S. K., Lakra, W. S. (2007). A non-invasive technique for rapid extraction of DNA from fish scales. *Ind. J. Exp. Biol.*, Vol. 45, pp. 992–997.
- LGC. (2018). DNA Quantification: Comparison of UV Spectrophotometry and PicoGreen Analysis. Available at: <https://www.lgcgroup.com/LGCGroup/media/PDFs/services/Extraction/DNAQuantification-Factsheet-LGC.pdf>.
- Muhammad, H., Iqbal, Z., Iqbal, M. U., Younas, T., Bashir, Q. (2016). An efficient method for DNA isolation from fish fin. *Pak. J. Agri. Sci.*, Vol. 53, no. 4, pp. 843–850. DOI:10.21162/PAKJAS/16.3998.
- Sambrook, J., Russell D. W. (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual (3rd Ed.)*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 1626 p.
- Silva, P. C., Malabarba, M-C., Vari R., Malabarba L. (2019). Comparison and optimization for DNA extraction of archived fish specimens. *MethodX*, Vol.6, pp.1433–1442. DOI:10.1016/j.mex.2019.06.001.
- Wilcockson, J. (1973). The Use of Sodium Perchlorate in Deproteinization During the Preparation of Nucleic Acids. *Biochem. J.*, Vol. 135, pp. 559–561.

A comparative analysis of different DNA extraction methods for fish tissues

Dyman T.M., Shostak L.V., Dubin O.V., Dyman N.O.

Nucleic acids extraction is the initial stage of molecular genetic research. The effectiveness of using a certain method of DNA extraction is determined by the amount of extracted DNA, the degree of probe degradation, the time consuming and laboriousness of the procedure. When researching rare, endangered species and populations, special attention is paid to extracting DNA from sources that do not cause destruction or death of individual. The current study was aimed at comparison the effectiveness of the most common methods of genomic DNA isolation from fish tissues for further use in the polymerase chain reaction. Essentially three DNA extraction methods were employed and compared for the quality of isolated DNA – the phenol-chloroform extraction method, the salt extraction method, and the sodium perchlorate extraction method. Samples of fins, liver and caver taken from sterlet individuals fixed in ethanol served as material for research. The study of the effect of DNA probe quality on PCR course was carried out using two types of PCR – site-specific, amplifying the fragment of *cytochrome-b* gene, and multilocus – ISSR-PCR with a trinucleotide primer (AGC)₆T. A comparison of DNA extraction methods confirmed that all of them enable obtaining high-quality DNA from both fresh and archival fish tissue samples for site-specific amplification.

The yield of nucleic acids using different fish tissues (fins, liver and caver) is not the same. Therefore, when it is necessary to obtain the maximum amount of DNA, it is advisable to use the salt extraction method. In case of ISSR-PCR, different degrees of DNA purification affected the course of amplification. Additional pu-

rification by the method of sorption on Silica allows removing possible PCR inhibitors and obtaining clear spectra of electrophoretic separation of amplification products, regardless of primary DNA quality.

Key words: DNA extraction methods, sterlet tissues, site-specific PCR, multilocus PCR.



Copyright: Димань Т.М. та ін. © This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.



ORCID iD:

Димань Т.М.

Димань Н.О.

<https://orcid.org/0000-0002-6428-1476>

<https://orcid.org/0000-0003-4087-2957>