

Събиране и съхранение на образци за генетични изследвания. Проблеми и предизвикателства при работа с фосилна ДНК

Автор: Димитра Лефтерова

За целта на филогеографските изследвания, а и с популяризирането на молекулярните изследвания като цяло, постоянно е нужно да се събират проби за ДНК анализ, както и да се работи с музейни образци и фосили.

При своята работа полевите биолози и ветеринари, е добре да спазват няколко процедури при събиране и съхранение на образци, с цел бъдещ ДНК анализ. Основната трудност при събирането на проби за генетичен анализ е съхранението им от ДНК деградация. Основния деградиращ агент на ДНК са ензимите с ДНК активност, те могат да присъстват в самата проба, но могат и да се появят от растящи микроорганизми в пробата. Основната цел на съхранение на пробите е да се инактивира тази активност или да се предотврати дейността на ензимите. Има няколко начина да се инактивира активността на ензимите, но те са скъпи или изискват реагенти, които нормално не се намират при полевите биолози или ветеринари. От друга страна, е най – лесно и евтино да се дехидратира пробата, с цел спиране на ензимна-

та активност. Най – честия, ефикасен и лесен начин да се направи това е:

- Дехидратация на пробата чрез силика гел или други изсушители. Те могат да се намерят в супермаркетите, магазини тип „направи си сам“, цветарски магазини, където ги използват за подсушаване на цветята. Изсушените проби могат вече лесно да се транспортират, като единствено остава да се съобразим с изискванията на конкретната страна за внос на такива продукти, с оглед евентуалното пренасяне на болестни микроорганизми или техни спори.

- Дехидратация на пробата с етанол / 70-100%/. По ниската концентрация на алкохола, помага за по-лесното пренасяне, тъй като не е опасно запалим, но същевременно при по – ниска концентрация е възможна частична активация на ензимната активност. Затова концентрация по – малка от 70% не се препоръчва. Същевременно друг алкохол освен етанол, например метанол, не се препоръчва, защото би могъл да попречи на последващата екстракция и амплификация на ДНК.

Така повечето съхранени проби, ще бъдат изсушени или поставени в етанол и е добре да се направи и следното:

- **Етикетиране.** Винаги слагайте етикети с означения на своите проби, за да знаете кога и къде сте ги съхранили, както и водете дневник на пробите. С времето това може да се окаже особено важно. Етикетата трябва да включва : референтен номер, дата на събиране на пробата, място, вида от който е взета пробата. Референтния номер, трябва да е същия като този във водения от Вас дневник, със същата информация като на етикета на пробата, плюс името на колектора, точната информация на мястото, включително GPS данни, плюс други наблюдения ако са считани за необходими. GPS данни е добре да има, защото е основна информация при филогеографските изследвания. Още нещо е добре да се има предвид, надписването да е с подходящ перманент маркер, за да не се окаже, че при пристигането си, пробата е вече с неясно съдържание.

- **Избягване на замърсяване на пробата.** Много лесно човешка ДНК може да попадне в пробата. За някои анализи, това не е проблем, тъй като анализите използват методи, които са видовоспецифични или се използват процедури, които не „вземат“ човешката ДНК от пробата. Въпреки това, при някои изследвания замърсяването на пробата с човешка ДНК е от значение. При взимането на пробата не е необходимо да носите ръкавици и маска, ако сте на полето, просто трябва да внимавате и да избягвате взимане или докосване на пробата с голи



ръце. Много по – важно е да избегнете смесване на пробите. Затова, винаги стерилизирайте/ дезинфекцирайте скалпела си преди манипулация, накрайника за взимане на екскременти или иглата при взимане на кръв.

- **Повече, не означава по – добре.** Понякога се стараем да съберем колкото може повече материал. Например старателното напълване на съда с тъкан или екскремент не е най – добрия начин за съхранение на пробата. Изпълвайки съда, вие оставате много малко място за изсушаващия агент. Добре е при поставянето на пробата, тя да е изцяло покрита, например с етанол, като така се уверите , че е добре съхранена, за да не се окаже че накрая имате много, напълно безполезни проби. Така, че ако имате желание да съберете по – голямо коли-

чество проба, по – добре разпределете пробата пропорционално в няколко съда, отколкото да я събирате в един и да няма място за етанола.

Видове проби

Косми – едни от най – добрите проби

Космите са може би едни от най – добрите проби за събиране. Те са едновременно лесни за съхранение и за транспортиране, както и да се получи добра ДНК от тях. Ако Вие сте хванали животно на полето или може да се доближите до животно в зоопарка, безспорно това е най – добрия метод за събиране на проби. Освен това, ако сте на полето е много по – лесно да намерите козина, закачена по храстите, което също е много добра проба. Ако отскубвате косми от животното, гледайте за груби косми, които са чисти и трудно се отскубват. Тези косми обикновено се отскубват с луковиците, които съдържат жива тъкан, от която може да се изолира ДНК. Достатъчно количество за изолиране на ДНК е 5 – 10 косъма с луковици от всеки индивид. Винаги се уверявайте, дали космите са с луковици, в противен случай са неизползваеми. Най – добрия начин за запазване на космените проби

е в сух, без восък, запечатан плик за писмо. Може да етикетирате пробата, като надпишете плика. Няколко плика може да поставите в отделен съд или найлонова торба, със силикагел или друг изсушител, за да се поддържат пробите сухи. Пликовете без восък имат пори, през които пробата диша.

Екскременти – може би следващите най – добри проби

Екскрементите или изпражненията са лесни за събиране и от тях може да се изолира ДНК, когато са съхранени свежи. Друга добра страна на пробите от екскременти е, че не се нуждаете от специални разрешения за транспортирането им, ако са съхранени в етанол. Въпреки, че в някои страни все още има експортни изисквания. Освен това те са удобни и с това че не изискват задържане на животното и така се избягва неговото стресиране, така че обикновено този начин на събиране на проби е за предпочитане.

Когато събирате проби от екскременти спазвайте следното: да бъдат възможно най – пресни; необходим е само външния слой с животински клетки. Вътрешния слой обикновено съдържа гъби, инсекти и други възможни, които ще доведат до нечисто получаване на ДНК. Външния слой се опира в животинския чревен път, и така в него остават клетки от покритието му. Ако външния слой е замърсен с гъби или инсекти, е възможно да попречи на изолирането на чиста ДНК. От друга страна е възможно да се случи да се взема проба при сухи условия и външния слой да е много изсъхнал, така че да не може да се вземе проба и изоли-



ра ДНК от него, дори и да е на няколко седмици. Много важно е да запомните, да не пипате пробата с голи ръце, от една страна да не замърсите пробата с Ваша ДНК, а от друга да предпазите своето здраве.. Най – добре да отчупите клонче от близко дърво, да го разцепите на две или обелите от кората и да използвате свежата повърхност за загребване на проба. Идеални съдчета за събиране на проби са 5 мл туби с капачки. Отваряте капачката и я оставяте изправена нагоре, като поднасяте отвора на тубата към мястото за вземане на проба. Използвайте клонката, за да остържете 1 – 2 см от повърхността в съда. След това може да вземете още една проба в друг съд. Така ще имате около 2 мл проба във всеки съд. След това допълнете съда с етанол / 70-100 %/, така че отношението проба/етанол да е 2/3. Затворете съда, опакувайте

го с парафилм / опаковъчно фолио , за да избегнете изтичания, изхвърлете пръчицата и вземете нова клонка за нов образец. Така събраните проби може да съхранявате на стайна температура. По специфични са условията и начини на събиране на екскременти при водни животни като делфините и дюгоните.

Тъканни проби – добра ДНК, трудни за транспорт

Тъканните проби могат да осигурят много добър материал за получаване на ДНК, но са трудни за транспортиране поради экспортните/импортни ограничения на различните държави. Ако сте хванали животни или работите в район където са чести случаите на умрели при автомобилни произшествия животни, както и ловни райони,



Вие ще можете да вземете тъканни проби и ще ви е жал да не се възползвате от случая да го направите. Когато решите да вземете тъканна проба, помнете, че е необходимо много малко количество и че трябва да дезинфектирате скалпела преди да вземете нова проба.

Ако сте попаднали на животно на пътя или сте заловили животно, най – доброто място за вземане на тъканна проба са ушите. Малка част около 1 – 2 см. , дори и по – малко са достатъчни за изолиране на добра ДНК като качество и количество. Малко парченце от ухото е по – добра проба от част от мускул, защото не гние така бързо. Ако имате достъп до месото, от пътно произшествие или лов, първо го помиришете, ако мирише лошо по – добре не взимайте проба, може да се окаже , че тя няма да свърши никаква работа, защото деградационните процеси са разрушили голяма част от ДНК, ако няма лоша миризма, отрежете малко парченце , няколко кв.мм от тъканта е достатъчна.

Най – добрия начин да съхраните тъканните проби е да ги поставите в етанол, като се уверите и запомните, че трябва пробата да е добре покрита с етанол. Ако сте отрязали няколко кв.мм, може да използвате 2мл туби с капачки, в които да я поставите и залееете с етанол. Отново увийте тубата /капачката/ с парфилм/опаковъчно фолио, за да предпазите от изтичане и я надпишете. Съхранените по този начин проби могат да стоят на стайна температура.

Кръвни проби – прекрасна ДНК, но скъпо

Получената ДНК от кръв е може би с най – доброто качество въобще, но е все още скъпа за получаване и екстракция. Освен това, за да получите кръв от животно, ще трябва да го обездвижите по някакъв начин или да го упоите, което не винаги е идеално за получаване на желаното количество проби. Най – добрия начин за събиране и съхраняване на кръвта е във вакумтейнери / с буферен агент ЕДТА EDTA / или с Изи Блъд Буфер/ Easy Blood Buffer (ЕВВ)/. Ако използвате вакумтейнери се убедете, че добре сте разтворили пробата във ЕДТА и е съхранявайте в хладилника. Ако използвате ЕВВ ще трябва да разтворите равен обем кръв и буфер и също съхранявайте в хладилник. Обикновено е нужно много малко количество кръв за получаване на ДНК, около 1мл кръв е напълно достатъчно за генетични изследвания.

Други проби

Кости и зъби също могат да послужат за получаване на ДНК, но е трудно и ненадежно. Освен това костите могат да се транспортират трудно, затова не ги препоръчваме като материал за генетични изследвания, освен по липса на друго.

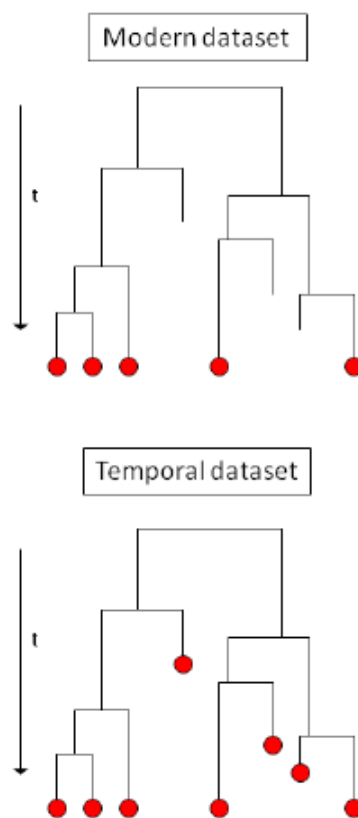
Гореописаният начин за събиране на проби касае случаите, когато имаме нужда пробата да стигне до лабораторията и веднага да бъде изследвана. По различно е когато искаме да съхраним пробата за дълго време, например години по различни причини, било защото в лабораторията има

твърде много проби, които физически не могат да бъдат обработени веднага, било защото бихме искали да съхраним проба за бъдещи изследвания. Най – препоръчителното ръзбира се е ДНК веднага да се изолира от получената проба и да се съхрани при -80 С. При невъзможност да се изолира веднага, тогава пробата е добре да бъде замразена при -80 С или поне при температура на нормален фризер. Тази проба може да бъде разтворена в етанол, но може и да се замрази сама по себе си чиста. В последния случай при възможности това може да стане направо на полето в преносим контейнер с течен азот. Когато искаме да съхраним проба за дълго време в етанол е желателно етанола да не бъде 70%, защото от опит е установено, че макар и бавно, при наличието дори и на малко количество вода, ДНК може напълно да деградира и когато ви е необходима, да се окаже че вече не може да работите с нея. Препоръчителната концентрация, установена опитно е 95-96% етанол и съхранение при минусови условия. Макар по – горе да е указано 100% етанол, на практика такава концентрация на етанола няма, максималната съществуваща концентрация е 96%. Указания етанол с 100% концентрация е етанол без 4% водно съдържание, а с 4% съдържание на бензен. Този етанол не е за препоръчване, защото бензена поврежда ДНК молекулата.

Фосилна ДНК

Вече три десетилетия се работи с фосилна ДНК. Макар някои изследвания да са неуспешни, поради замърсявания на пробата или неуспешна ек-

стракция на ДНК, въвеждането на нови молекулярно генетични техники допринасят съществено за развитието на работата с фосилна ДНК, така необходима за добри филогенетични изследвания. Фосилната ДНК ни помага да проследим историческия и древен генен поток във времето, което ни дава динамична времева и географска яснота за генетичното разнообразие. Съчетано с данните за околната среда и хронологична информация / напр. радиодатировка/ е възможно да се правят връзки между климатичните промени, антропологичното влияние и промените в генофонда на популациите / видовете. Анализите



основани на фосилна ДНК дават възможност да се регистрират популационната динамика, стеснявания, изчезвания, разширения, реколониза-

ция назад до късен плейстоцен. Фосилна ДНК е изолирана успешно от фосили на 50 000 год, но в редки случаи и на повече от 100 000 години. Работата с фосилна ДНК дава възможност за проследяване във времето на изчезнали линии от еволюционните отношения, нещо което не е възможно да се направи само от проби от една времева точка и то съвременна. Това е интересно от гледна точка на проследяване на стеснения и други еволюционни събития, случили се много преди съвременните представители.

Сравнителна схема на изследвания основани само на съвременни данни и на данни от различен времеви период. Докато първата дава възможност да се видят само съвременните видове, съществуващи до днес, втората е много по – информативна, защото включва и изчезнали видове.

Възможността да се работи с ДНК от различен времеви интервал дава много по – широка представа за еволюционните процеси, за развитието на отделните популации/видове във времето и пространството. Дава отговори по отношение на съвременния статус на дадена популация/вид, дали нейния генофонд е в резултат на свиване или начално разширение, което е от значение за опазване на видовото разнообразие.

Проблеми и предизвикателства за работа с фосилна ДНК

Работата с фосилна ДНК е голямо предизвикателство и изисква приемането на твърди стандарти на работа, с цел да се получат добри и автентични резултати. Когато има успех на получа-

ване на ДНК от фосили, обикновено става въпрос за мтДНК, рядко има успешно изолирани нуклеарни фрагменти. мтДНК обичайно се изолира в малко на брой копия / до 100 молекули/ и е доста накъсана / от 100 -500 кб фрагменти/. Освен това фосилната ДНК често има *post mortem* модификации или деструкции, както и може и да има крослинкове. Установено е, че проблемите на работа с фосилна ДНК / малкото накъсани копия, деградацията/ се дължат на условията на средата, където са намерени фосилите и също така как са съхранявани в колекциите. Температурата и влагата играят съществена роля за получаване и работа с фосилна ДНК. Трудно и почти невъзможно е да се изолира ДНК от фосили били на топли и влажни места, докато е много по – висока вероятността да се направи добър анализ от фосили от студени и сухи места.

Критерии и насоки на работа с фосилна ДНК за получаване на автентични резултати от изследванията:

1. Отделна пре – PCR лаборатория, строго определена за работа с фосилна ДНК, където да са приети строго определени начини на работа, които да предотвратяват замърсявания на пробите при анализ.
2. Използването на костюм, ръкавици, маска, презпазен лицещит, са задължителни, с цел минимизиране на вероятността от замърсявания.
3. Да са бъдат включени няколко негативни / празни/ екстракции

на ДНК и PCR контроли, които да са включени на всеки експеримент, с цел проверка автентичността на пробите.

4. Да се работят малко на брой проби едновременно, например - две празни проби и 8 с фосилен материал на всяка екстракция.
5. На всяка екстракция да се прави независима, отделна репликация, с цел повторимост на резултата.
6. Клониране или директно секвениране на независимите PCR амплификации, в случай че материала за изследване е много малко количество.
7. Спазване на строга дезинфекция на помещението, всички прибори, уреди и апарати с помощта на дезифенктанти и УВ лампи.

- Център по геогенетика към Природонаучния музей към Университета в Копенхаген – Дания

<http://geogenetics.ku.dk/>

- Палео и архигенетика към Еберхард Карлс Университет в Тюбинген, Германия

<http://www.geo.uni-tuebingen.de/arbeitsgruppen/ur-und-fruehgeschichte-und-archaeologie-des-mittelalters/forschungsbereich/palaeogenetik/arbeitsgruppe.html>

- Лабораторията Шапиро по фосилна ДНК към Департамента по биология към Университета в Пенсилвания, САЩ

<https://homes.bio.psu.edu/people/faculty/bshapiro/>

Центрове и лаборатории за работа с фосилна ДНК:

- Австралийски център за работа с фосилна ДНК – Аделаида, Австралия.

<http://www.adelaide.edu.au/acad/>

- Палео ДНК лаборатория в Университета Лейкхед – Канада

<http://www.ancientdna.com/>