

ANALIZA WYDAJNOŚCI IZOLACJI DNA KRÓLIKÓW W ZALEŻNOŚCI OD RODZAJU POBRANEGO MATERIAŁU BIOLOGICZNEGO

Zuzanna Siudak^{1#}, Sylwia Pałka²

¹Zakład Hodowli Drobnego Inwentarza, Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy,
32-083 Balice k. Krakowa

²Katedra Genetyki, Hodowli i Etologii Zwierząt, Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt,
Uniwersytet Rolniczy im. H. Kołłątaja w Krakowie, al. Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków

#E-mail: zuzanna.siudak@iz.edu.pl

Abstrakt

Celem pracy było zbadanie wydajności izolacji DNA królików termondzkich białych w zależności od rodzaju pobranego materiału biologicznego. Doświadczenie przeprowadzono w Stacji Doświadczalnej Katedry Genetyki, Hodowli i Etologii Zwierząt Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie. Materiał badawczy stanowiły krew, włosy, mocz oraz ślina pobrana od sześciu samców królików rasy termondzkiej białej. W 84. dniu życia zwierząt, pobrano od nich przyżyciowo ślinę i włosy, a w czasie obróbki poubojowej krew oraz mocz. Izolacji DNA z pobranych tkanek dokonano z zastosowaniem komercyjnego zestawu do izolacji kwasów nukleinowych GeneMATRIX Tissue DNA Purification Kit (EURx). Wyizolowane DNA poddano ocenie przy użyciu spektrofotometru UV-VIS przy długości fali równej 260 i 280 nm. Określono czystość i zawartość badanego DNA. Badania wykazały, że rodzaj pobranego materiału biologicznego wpływa na zawartość i czystość DNA. Najwyższą zawartością DNA cechowały się próbki kwasu wyizolowane z krwi. Największą czystością charakteryzowały się preparaty DNA wyizolowane z moczu.

Słowa kluczowe: królik, DNA, izolacja

Wstęp

Izolacja i oczyszczanie DNA jest kluczowym etapem większości procedur stosowanych w biologii molekularnej. Celem tych działań jest uzyskanie wysokiej jakości i czystości materiału biologicznego wykorzystywanego do prowadzenia dalszych analiz (Stryer, 1999). Pierwszą opisaną metodą izolacji kwasów nukleinowych jest procedura izolacji „nukleiny” opracowana przez Mieschera w 1869 roku. Wyróżniono w niej dwa etapy, na które składało się przygotowanie komórek oraz izolacja poprzedzona uzyskaniem jąder komórkowych (Gabryelska i in., 2009). W dzisiejszych czasach istnieje wiele metod izolacji kwasów nukleinowych, a ciągle opracowywane są nowe i bardziej wydajne procedury. Ponadto dąży się do tego, aby wykonywać jak największą liczbę analiz jednocześnie (Kapińska i Szczerkowska, 2004; Słomski, 2008).

Obecnie metody izolacji DNA dzieli się na trzy grupy. W pierwszej, do izolacji DNA wykorzystuje się mieszaninę fenolu z chloroformem stosowaną do odbiałczania preparatów. Druga grupa metod przebiega z wysoleniem białka z otrzymanych lizatów komórek. Nato-

miast w trzeciej grupie metod wykorzystuje się odpowiedni nośnik, którego zadaniem jest wiązanie DNA, następnie odmycie zanieczyszczeń i uwolnienie wiązanego DNA. Przez wielu, w tym Ryszarda Słomskiego, autora książki *Analiza DNA* (2008), nadal jedną z najlepszych i najbardziej efektywnych metod izolacji DNA pozostaje metoda z wykorzystaniem fenolu i chloroformu. Dostarcza ona preparaty charakteryzujące się wysokim stopniem czystości, które można z powodzeniem wykorzystać do dalszych analiz, klonowania czy reakcji PCR.

Zgodnie z ustawą z dnia 15 stycznia 2015 roku (Dz.U., 2015) dotyczącą ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych, doświadczeniem naukowym wymagającym zgody Lokalnej Komisji Etycznej nie są: „czynności, które zgodnie ze sztuką lekarsko-weterynaryjną nie powodują u zwierzęcia bólu, cierpienia, dystresu lub trwałego uszkodzenia organizmu, w stopniu równym ukłuciu igłą lub intensywniejszym”.

Ustawa ogranicza zakres zabiegów, które można wykonywać na zwierzętach, co rodzi problem polegający na braku możliwości pobierania przyżyciowo materiału biologicznego od zwierząt. Obecnie poszukuje się alternatywnych metod pozyskiwania materiału do badań naukowych, stąd też celem niniejszej pracy było zbadanie wydajności izolacji DNA królików termondzkich białych w zależności od rodzaju pobranego materiału biologicznego.

Material i metody

Doświadczenie przeprowadzono w Stacji Doświadczalnej Katedry Genetyki, Hodowli i Etoologii Zwierząt Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie. Materiał doświadczalny stanowiły krew, włosy, mocz oraz ślina pobrana od sześciu samców królików rasy termondzkiej białej. Przez pierwszych 35. dni życia króliki przebywały z matkami w metalowych klatkach zaopatrzonych w domki wykotowe. Hala, w której przebywały zwierzęta, była wyposażona w instalację wodną (poidła smoczkowe) i oświetleniową (14L:10D) oraz wentylację wymuszoną. Od chwili odsadzenia w 35. dniu życia, aż do 84. dnia zwierzęta utrzymywano w tej samej hali w systemie baterijnym przeznaczonym do towarowego odchowu królików, w metalowych klatkach pozbawionych ściółki. Zarówno przy matkach, jak i w późniejszym okresie życia króliki żywiono do woli komercyjną granulowaną paszą pełnoporcjową, o zawartości 10,2 MJ energii metabolicznej, 16,5% białka ogólnego oraz 14% włókna surowego. Takie żywienie pokrywało zapotrzebowanie zwierząt na składniki pokarmowe, podane w normach żywieniowych (Gugołek in., 2011).

W dniu uboju od każdego biorącego udział w doświadczeniu królika pobrano próbkę śliny, dokonując wymazu z jamy ustnej przy pomocy drewnianych wymazówek (Polnet, Poznań). Od tych samych zwierząt pobrano także próbki włosów zakończonych cebulkami. Zarówno próbki śliny, jak i włosów umieszczono w plastikowych probówkach wirówkowych.

Króliki poddano ubojowi i obróbce poubojowej w 12. tygodniu życia, przy masie ciała wynoszącej około 2,6 kg, po 24-godzinnym głodzeniu ze stałym dostępem do wody pitnej. Zwierzęta oszłamiano, skrwawiano, skórowano i patroszono. W czasie skrwawiania od królików pobrano krew do probówek typu Eppendorf o pojemności 2 ml, do których wcześniej dodano kwas wersenowy (EDTA). Po skórowaniu, ale przed wypatroszeniem tuszek, przy użyciu jednorazowych strzykawek o pojemności 2 ml pobrano mocz z pęcherzy moczowych królików, który również umieszczono w dwumililitrowych probówkach Eppendorfa. Wszystkie zgromadzone próbki pakowano do woreczka zbiorczego, a następnie mrożono przez 72 h w temperaturze -18°C .

Izolacji DNA z pobranych tkanek dokonano z zastosowaniem GeneMATRIX Tissue DNA Purification Kit (EURx).

Izolacja DNA z krwi

Z każdej pobranej próbki odmierzone 200 µl krwi i przeniesiono ją do probówek typu Eppendorf o pojemności 1,5 ml. Po pięciominutowej inkubacji w temperaturze pokojowej do krwi dodano 10 µl proteiny K.

Izolacja DNA ze śliny

Dokładnie oddzielono wateę od drewnianej części wymazówki, a następnie przeniesiono ją do probówki typu Eppendorf o pojemności 1,5 ml. Do próbek dodano 350 µl buforu do lizy T oraz 20 µl proteiny K. Próbkę umieszczono na bloku grzewczym nastawionym na 56°C i inkubowano przez około godzinę.

Izolacja DNA z moczu

Do 1,5 ml probówek Eppendorfa odmierzone około 1 ml moczu z każdej pobranej próbki. Następnie próbki poddano wirowaniu i oddzielono powstały supernatant od pelletu. Do oddzielonych komórek dodano 350 µl buforu do lizy T i 10 µl proteiny K. Przygotowane próbki inkubowano w temperaturze pokojowej.

Izolacja DNA z włosów

Z pobranych włosów oddzielono cebulki, które przeniesiono do 1,5 ml probówek typu Eppendorf. Do przygotowanych włosów dodano 350 µl buforu do lizy T, 20 µl proteiny K i 20 µl 1M DTT. Próbkę inkubowano przez około godzinę w temperaturze 56°C.

Po uprzednim przygotowaniu próbek, do każdej z nich dodano bufor Sol T, a następnie inkubowano przez 10 minut w temperaturze 70°C. Po inkubacji do probówek dodano 96% etanol i wirowano, aby kolejno przenieść ich zawartość do kolumny ze złożem krzemionkowym. Dokonano wielokrotnego wirowania kolumn na zmianę z płukaniem złoża krzemionkowych buforami płuczającymi w celu oczyszczenia genomowego DNA z wcześniej użytych środków chemicznych takich jak etanol. Oczyszczone DNA poddano elucji z zastosowaniem buforu elucyjnego.

Wyizolowane DNA oceniono przy użyciu spektrofotometru UV-VIS przy długości fali równej 260 i 280 nm. Stosunek wartości absorpcji A260 do A280 pozwolił na określenie czystości i zawartości badanego DNA.

Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą pakietu statystycznego SAS (2014). Wykonano jednoczynnikową analizę wariancji, gdzie czynnik doświadczalny stanowił rodzaj pobranego materiału biologicznego. Istotność różnic między uzyskanymi średnimi zbadano testem Tukeya.

Wyniki

Jak wynika z tabeli 1, badane materiały biologiczne różnią się między sobą ilością DNA. Stwierdzono istotne różnice w ilości DNA między próbkami wyizolowanymi z krwi i moczu, moczu i włosów oraz z włosów i śliny. Krew i włosy nie różniły się ilością wyizolowanego DNA. Stosując GeneMATRIX Tissue DNA Purification Kit (EURx) najwyższe wartości ilości DNA można uzyskać izolując ten kwas z krwi. Najniższe wartości uzyskano podczas izolacji DNA z moczu i śliny.

Uzyskane niskie wartości wynikają z niewielkiej zawartości komórek w obydwu badanych płynach biologicznych. Ślina w dużej mierze składa się z wody (94–99,5%), a pozostałą część zajmuje element stały, gdzie głównym składnikiem organicznym są substancje białkowe, takie jak enzymy, białka surowicy krwi, mucyny, immunoglobuliny, substancje grupowe krwi, kalikreina czy laktoferyna. Żadna z wymienionych substancji nie zawiera ma-

teriału genetycznego, więc DNA pozyskać można jedynie ze złuszczonej komórki nabłonka jamy ustnej (Szydłarska i in., 2008). Podobne utrudnienie pojawia się podczas izolacji DNA z moczu. Substancjami organicznymi występującymi w moczu są: albuminy, mocznik, amoniak, kreatynina i glukoza. Tak jak w przypadku śliny, żadna z powyższych substancji nie jest nośnikiem materiału genetycznego. Stąd też w fizjologicznym moczu źródłem kwasów nukleinowych mogą być jedynie komórki złuszczonego nabłonka wyściełającego drogi układu moczowego (Okrağła i in., 2014).

Tabela 1. Zawartość wyizolowanego DNA w zależności od rodzaju badanego materiału biologicznego
Table 1. The content of isolated DNA depending on the type of biological material tested

Materiał biologiczny Biological material	Ilość DNA (ng/μl) Amount of DNA (ng/μl)		
	Średnia Mean	SD	Min-Max
Krew Blood	55,86 ^a	66,00	14,25 – 192,62
Mocz Urine	5,35 ^b	2,24	3,05 – 10,20
Ślina Saliva	8,37 ^b	3,99	4,12 – 14,42
Włosy Hair	37,37 ^a	21,54	8,72 – 61,06

Objaśnienie: a, b – średnie w wierszach oznaczone różnymi literami różnią się istotnie ($P \leq 0,05$)
Explanation: a, b – means marked with different letters are significantly different ($P \leq 0,05$)

Zauważono duże rozbieżności osobnicze w ilości pozyskanego DNA w poszczególnych tkankach. Największe różnice pojawiły się podczas izolowania DNA z krwi, gdzie wybitnie wysoka wartość pozyskanego kwasu wynosiła 192,62 ng/μl, a najniższa zaledwie 15,66 ng/μl. Najbardziej jednorodnie wyniki uzyskano w grupie, w której izolowano DNA z moczu i śliny. Po przeanalizowaniu wyników dotyczących ilości pozyskanego DNA z różnych materiałów biologicznych nie stwierdzono, aby któryś z badanych królików wykazywał najwyższe lub najniższe stężenie badanego kwasu we wszystkich pobranych materiałach. Powtórzenie doświadczenia na większej grupie badawczej mogłoby dać bardziej miarodajne wyniki, które mogłyby wykluczyć ewentualne uwarunkowania osobnicze. Wykonanie powtórnych analiz w oparciu o inne tkanki, np. wątroby czy nerek mogłoby dostarczyć wielu nowych informacji, które pomogłyby potwierdzić lub wykluczyć wnioski zamieszczone w niniejszej pracy.

Przeprowadzona analiza statystyczna wykazała, że rodzaj pobranego materiału biologicznego wpływa istotnie na czystość uzyskanego w wyniku izolacji DNA. Stwierdzono statystycznie istotne różnice w tym aspekcie pomiędzy krwią a moczem, moczem i włosami, moczem i śliną oraz włosami i śliną. Przeprowadzona analiza statystyczna nie wykazała istotnych różnic pomiędzy krwią a włosami oraz krwią a śliną.

Własności spektroskopowe makrocząsteczek pozwalają na określenie przybliżonej czystości preparatów kwasów nukleinowych. Czystość ustala się dokonując obliczeń na podstawie wartości stosunku absorpcji przy długości fali 260 nm i 280 nm (A_{260}/A_{280}). Wolny od zanieczyszczeń dwuniciowy DNA (dsDNA) ma wartość współczynnika A_{260}/A_{280} równą 1,8. Wartość większa od 1,8 świadczy o zanieczyszczeniu preparatu RNA, natomiast gdy wartość współczynnika A_{260}/A_{280} jest mniejsza od 1,8 można przypuszczać, że wyizolowany DNA został zanieczyszczony białkami (biochigen.slam.katowice.pl/praktikum/013.pdf).

Z tabeli 2 wynika, że najbardziej zbliżoną do 1,8 średnią wartość uzyskano izolując DNA z moczu. Również w tej grupie uzyskano największe różnice pomiędzy uzyskanymi wynikami (najniższa wartość – 1,20, najwyższa wartość – 2,44). Porównywalne rozbieżności uzyskano w grupie, w której izolowano DNA z krwi. Niejednorodność wyników stosunku absorpcji $260/A_{280}$ w obydwu grupach może wynikać ze złego doboru kitu do izolacji DNA. GeneMATRIX Tissue DNA Purification Kit (EURx) nie jest przeznaczony do stoso-

wania na materiale świeżym, daje lepsze wyniki, gdy z jego wykorzystaniem izoluje się DNA z plam pochodzenia biologicznego, takich jak plamy krwi czy nasienia.

Tabela 2. Czystość wyizolowanego DNA w zależności od rodzaju badanego materiału biologicznego
Table 2. Purity of isolated DNA depending on the type of biological material tested

Materiał biologiczny Biological material	Stosunek absorbancji A260/A280 Absorbance ratio A260/A280		
	Średnia Mean	SD	Min-Max
Krew Blood	1,28 ^a	0,28	0,93 – 1,66
Mocz Urine	1,68 ^b	0,46	1,20 – 2,44
Ślina Saliva	1,37 ^b	0,14	1,24 – 1,64
Włosy Hair	1,18 ^a	0,21	1,02 – 1,60

Objaśnienie: a, b – średnie w wierszach oznaczone różnymi literami różnią się istotnie ($P \leq 0,05$)
Explanation: a, b – means marked with different letters are significantly different ($P \leq 0,05$)

Najbardziej powtarzalne wyniki uzyskano w grupie, w której dokonano izolacji DNA ze śliny, jednak wartości współczynnika absorbancji A260/A280 nie są bliskie 1,8. Wynoszą średnio 1,37, co może świadczyć o zanieczyszczeniu preparatów białkiem. Również w przypadku DNA wyizolowanego z włosów można zauważyć, że zostało ono zanieczyszczone, a uzyskana średnia wartość wynosi 1,18.

Omówienie wyników

Z przeglądu literatury zarówno polskiej, jak i światowej wynika, że do tej pory nikt nie zbadał różnic w wydajności izolacji DNA w zależności od rodzaju pobranego materiału biologicznego u królików, dlatego niemożliwe jest porównanie otrzymanych w badaniu wyników z innymi, uzyskanymi dla tego gatunku.

Metodami izolacji genomowego DNA zajęli się Ghatak i in. (2013). Badacze dokonali analizy preparatów, które uzyskali podczas izolacji DNA z ludzkiej krwi, śliny, moczu i włosów. W przeprowadzonym doświadczeniu uzyskano następujące średnie zawartości DNA w poszczególnych grupach próbek: krew – 86 ng/μl, ślina 83 ng/μl, mocz – 31 ng/μl, włosy – 49 ng/μl. Podobnie jak w badaniach własnych najniższą zawartość uzyskano izolując DNA z moczu. Wszystkie otrzymane przez wspomnianych autorów wartości są wyższe, niż te, które uzyskano podczas izolacji DNA króliczego. W badaniach Prośniaka i in. (2006) dokonano porównania i oceny wydajności różnych metod izolacji DNA z plam nasienia, krwi i śliny pochodzących od ludzi metodą QuantiBlot. W przeprowadzonym doświadczeniu stosowano różne metody izolacji, w tym również wykorzystano komercyjne zestawy do izolacji kwasów nukleinowych (Fast DNA, Sherlock, DNeasy, Wizard Genomic Purification Kit–Promega). Z krwi ludzkiej wyizolowano DNA, którego średnie ilości wynosiły kolejno 11,25 ng/μl, 27,00 ng/μl, 90,00 ng/μl, 2,44 ng/μl. Kitu Sherlock oraz Wizard Genomic Purification Kit użyto do wyizolowania DNA z ludzkiej śliny. Otrzymane średnie wartości wynosiły: 2,06 ng/μl i 0,37 ng/μl. Porównując do otrzymanych wyników własnych, zawartości DNA wyizolowanego z krwi były podobne, natomiast ilość DNA uzyskana ze śliny w doświadczeniu wykonanym przez zespół Prośniaka i in. (2006) była znacznie niższa. Małodobra i in. (2011) podjęli się próby sprawdzenia wydajności trzech komercyjnych zestawów do izolacji DNA i RNA ze zróżnicowanego materiału klinicznego i dowodowego, przy użyciu automatycznej stacji Janus. W przeprowadzonym doświadczeniu wyizolowano DNA z pełnej, mrożonej krwi ludzkiej, a jego średnie stężenie wynosiło 14,7 ng/μl. W badaniu własnym uzyskano wyższe średnie wartości ilości DNA. Di Pietro i in. (2011) wykonali doświadczenie, w którym izolowali

genomowe DNA z pełnej krwi ludzkiej przechowywanej w temperaturze -20°C . DNA izolowano na dwa sposoby: z wykorzystaniem mieszaniny fenol-chloroform i z wykorzystaniem kolumn ze złożem krzemionkowym. Średnia zawartość DNA wyizolowanego metodą kolumnową była niższa niż w badaniu własnym i wynosiła 10,85 ng/ μl .

Ghatak i in. (2013) w badaniach nad metodami izolacji ludzkiego genomowego DNA określili także jakość uzyskanego kwasu deoksyrybonukleinowego. W swoim badaniu dokonali analizy próbek DNA uzyskanego z krwi, włosów, moczu i śliny. Średnie wartości współczynnika absorbancji wynosiły kolejno: 1,86; 1,72; 1,48 i 1,57. W przeciwieństwie do wyników uzyskanych w doświadczeniu własnym, DNA uzyskane z moczu cechowało się najniższą czystością. DNA izolowane z włosów posiadało wysoką wartość współczynnika absorbancji, kiedy preparaty DNA z włosów króliczych charakteryzowały się niską czystością.

Di Pietro i in. (2011) badając wydajność izolacji genomowego DNA z pełnej krwi ludzkiej przechowywanej w temperaturze -20°C metodą fenol-chloroform i przy użyciu kolumn ze złożem krzemionkowym dokonali analizy czystości uzyskanego DNA. Współczynnik absorbancji A260/A280 dla DNA wyizolowanego metodą kolumnową wynosi średnio 1,98. DNA w badaniu Di Pietro in. (2011) jest mniej zanieczyszczone i jakościowo lepsze niż DNA uzyskane z krwi króliczej.

W badaniach Salazara i in. (1998) dokonano porównania jakości DNA wyizolowanego ze świeżej krwi z dodatkiem EDTA, skrzepłej krwi oraz poddanej kriokonserwacji krwi ludzkiej. Krew z dodatkiem antykoagulantu, jakim jest EDTA, posiadała średnią wartość współczynnika absorbancji 1,96. W porównaniu z wyizolowanym DNA króliczym, DNA wyizolowane z krwi ludzkiej cechuje się lepszą jakością i czystością.

W doświadczeniu Małodobrej i in. (2011) dotyczącym sprawdzenia wydajności trzech komercyjnych zestawów do izolacji DNA i RNA wykazano, że wartość współczynnika absorbancji A260/A280 dla pełnej, mrożonej krwi ludzkiej wynosi średnio 1,04. Wynik nie jest zbliżony do idealnej wartości współczynnika A260/A280, jednak jest porównywalny z wynikami, które uzyskano w przeprowadzonym badaniu własnym.

Podsumowanie

Nawiązując do wspomnianej w niniejszej pracy ustawy dotyczącej ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych, niezbędnym jest posiadanie zgody Lokalnej Komisji Etycznej do wykonywania czynności, które powodują u zwierzęcia ból, cierpienie, dystres lub trwałe uszkodzenie organizmu, w stopniu równym ukłuciu igłą lub intensywniejszym. Jak potwierdzają przeprowadzone badania własne, pozyskane preparaty DNA z alternatywnych materiałów biologicznych cechują się niższą zawartością tego kwasu, niż preparaty wyizolowane z krwi, stanowiącej typowy płyn biologiczny wykorzystywany powszechnie w badaniach naukowych.

Pomimo istniejących możliwości pozyskania kwasów nukleinowych z niekonwencjonalnych materiałów biologicznych, których pobranie nie wpływa na dobrostan zwierzęcia, to najlepszą wydajność uzyskano dla materiału biologicznego pozyskanego metodą inwazyjną, w przypadku niniejszych badań – krwi.

Piśmiennictwo

- Di Pietro F., Ortenzi F., Tilio M., Concetti F., Napolioni V. (2011). Genomic DNA extraction from whole blood stored from 15 to 30 years at -20°C by rapid phenol-chloroform protocol: A useful tool for genetic epidemiology studies. *Molecular and Cellular Probes.*, 25: 44–48.
- Gabryelska M.M., Szymański M., Barciszewski J. (2009). DNA – cząsteczka, która zmieniła naukę. Krótka historia odkryć. *NAUKA*, 2: 111–134.
- GeneMATRIX Tissue & Bacterial DNA Purification Kit. Kit for isolation of total DNA from human and animal tissues and bacteria Cat. no. E3551 Version 1. 2009
- Ghatak S., Muthukumaran R.B., Nachimuthu S.K. (2013). A simple method of genomic DNA extraction from human samples for PCR-RFLP analysis. *J. Biomol. Tech.*, 24(4): 224–231.
- Gugołek A. (red.) (2011). Zalecenia żywieniowe i wartość pokarmowa pasz. Zwierzęta futerkowe. Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt PAN, Jabłonna.
- Kapińska E., Szczerkowska Z., (2004). Personal identification based on nuclear DNA extracted from bones of deceased individuals. *Problems of Forensic Sciences*, LX: 104–116.
- Małodobra M., Jonkisz A., Kowalczyk E., Lebioda A., Bartnik B., Świątek B. (2011). Wydajność trzech komercyjnych zestawów do izolacji DNA i RNA ze zróżnicowanego materiału klinicznego i dowodowego, przy użyciu automatycznej stacji Janus. *Arch. Med. Sąd. Krym.*, LXI: 51–57.
- Okrągła E., Szychowska K., Wolska L. (2014). Mechanizmy utrzymania sterylności układu moczowego. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 68: 684–694.
- Prośniak A., Gloc E., Berent J., Bąbol-Pokora K., Jacewicz R., Szram S. (2006). Ocena wydajności różnych metod izolacji DNA w plamach nasienia krwi i śliny metodą Quanti-Blot. *Arch. Med. Sąd. Krym.*, LVI: 19–23.
- Salazar L.A., Hirata M.H., Cavalli S.A., Machado M. O., Hirata R.D.C. (1998). Optimized procedure for DNA isolation from fresh and cryopreserved clotted human blood useful in clinical molecular testing. *Clinical Chemistry*, 44: 1748–1750.
- SAS Institute INC. (2014). The SAS System for Windows. Version 9.4 Cary, NC, USA.
- Słomski R. (2008). Analiza DNA, teoria i praktyka. WUPP, Poznań, ss. 44–53.
- Stryer L. (1999). *Biochemia*. Wyd. 2. PWN, Warszawa.
- Szydłarska D., Grzesiuk W., Kupstas A., Bar-Andziak E. (2008). Ślina jako materiał diagnostyczny. *For. Med. Rodz.*, 2(6): 454–464.
- https://www.cm.umk.pl/images/users/47/Jednostki_miedzywydzialowe/Doswiadczenia_na_Zwierze-tach/2015/Ustawa_o_ochronie_zwierzat_wykorzystywanych_do_celow_naukowych_lub_edukacyjnych.pdf
- <http://biochigen.slam.katowice.pl/praktikum/013.pdf>

Zatwierdzono do druku: 25 IV 2023

ANALYSIS OF DNA ISOLATION EFFICIENCY DEPENDING ON THE TYPE OF BIOLOGICAL MATERIAL COLLECTED FROM RABBITS

Zuzanna Siudak, Sylwia Palka

SUMMARY

The aim of the study was to examine the efficiency of DNA isolation in Termond White rabbits depending on the type of collected biological material. The experiment was conducted in the Experimental Station of the Department of Genetics, Animal Breeding and Ethology of the University of Agriculture in Kraków. The research material was blood, hair, urine and saliva collected from six male Termond White rabbits. Saliva and hair were collected *ante-mortem* from animals at 84 days. Blood and urine were collected during *post-mortem* treatment. DNA isolation was done using the commercial GeneMATRIX Tissue DNA Purification Kit (EURx). The isolated DNA was evaluated using a UV-VIS spectrophotometer at a wavelength of 260 and 280 nm. The purity and content of the tested DNA were determined. Studies have shown that the type of biological material affects the content and purity of DNA. The highest content of DNA was in samples isolated from blood. The highest purity was detected in DNA preparations isolated from urine.

Key words: rabbit, DNA, isolation