

УДК 575.21

ОРГАНИЗАЦИЯ БАНКА БИОМАТЕРИАЛОВ И ДНК ДЛЯ ПОПУЛЯЦИОННО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ЖИВОТНЫХ

© 2024 г. В. Н. Воронкова^{1, *}, А. К. Пискунов¹, Э. А. Солошенко¹, Ж. В. Самсонова^{1, 2},
Ю. А. Столповский¹

¹ Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, Россия

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

*e-mail: valery.voronkova@gmail.com

Поступила в редакцию 08.05.2024 г.

После доработки 17.05.2024 г.

Принята в печать 27.05.2024 г.

Биобанки играют важную роль в популяционно-генетических исследованиях животных, так как представляют собой ценный ресурс для сохранения генетического разнообразия *ex situ* и исследований в области эволюции, зоологии, экологии и генетики. Одной из основных задач биобанков является сохранение образцов генетического материала различных видов животных, что позволяет сохранить информацию о генетическом разнообразии и поддерживать популяции *in situ*. Это особенно актуально для редких и уязвимых видов, пород животных и сортов растений, у которых генетическое разнообразие может снижаться из-за сокращения численности популяций. Биобанки позволяют обмениваться образцами и данными, что играет важную роль в изучении эволюции и происхождения различных видов, помогая ученым исследовать процессы дивергенции и адаптации. Они также служат источником для работ при изучении генетических заболеваний, поведенческих особенностей, взаимодействия видов в экосистемах. Биобанк является базой для проведения различных видов генетических исследований, таких как секвенирование геномов, исследование филогенеза, анализа изменчивости ДНК и функциональной геномики, что в свою очередь предоставляет возможность для разработки новых методов детекции генетических заболеваний, геномной селекции, а также для сохранения и восстановления популяций животных. Таким образом, биобанкирование играет важную роль в популяционно-генетических исследованиях животных, предоставляя ученым доступ к широкому спектру генетической информации, необходимой для понимания и сохранения биоразнообразия нашей планеты. Вопрос экологического и эффективного хранения биоматериала как никогда актуален. В данном обзоре мы рассматриваем различные подходы к организации банка биоматериалов и ДНК в сфере популяционно-генетических исследований животных, особенности их сбора, транспортировки, процессинга и хранения.

Ключевые слова: биобанк, хранение биоматериала и ДНК, экстракция ДНК, транспортировка биоматериалов, технология сухих пятен крови

DOI: 10.31857/S0042132424050067 EDN: OGGJGU

ВВЕДЕНИЕ

Стремительный прогресс в сфере геномных технологий позволяет получать огромные массивы информации в короткие сроки, а также эффективно использовать биоматериал с различной степенью сохранности ДНК. Требования к качеству исходного материала варьируют в зависимости от целей исследований и применяемых

технологий (Love Stowell et al., 2018). Подход к хранению образцов нуждается в модернизации и оптимизации, чтобы соответствовать современным нуждам исследователей (Caenazzo et al., 2020). В научном сообществе биобанки создаются уже более 100 лет различными учреждениями по всему миру (De Souza et al., 2013). Биобанки представляют собой большие хранилища био-

образцов, начиная от образцов животных и заканчивая образцами растений и микробов, которые используются в исследовательских целях. В мире существует более 100 национальных банков генов животных, и некоторые из них имеют значительные коллекции; например, коллекции США и Бразилии насчитывают 1.3 млн и 1.9 млн образцов от 64 932 и 30 168 животных, соответственно (Blackburn et al., 2024). По данным GGBN (Global Genome Biodiversity Network) всего 13 записей относятся к доместичированным видам животных (Groeneveld et al., 2016). В Европе по данным EUGENA (European Genebank Network for Animal Genetic Resources) на 2023 г. зарегистрировано 14 биобанков образцов животных (табл. 1, <https://www.eugena-erfp.net/en/>).

Во многих странах можно обнаружить несколько небольших биобанков домашних животных и менее формализованных коллекций образцов. Учреждения, в которых они размещены, варьируют от ветеринарных клиник, зоопарков, компаний по разведению и диагностике, национальных генетических банков сельскохозяйственных животных до научно-исследовательских институтов и университетов (Groeneveld et al., 2016). Перечислим наиболее известные из крупных биобанков (табл. 2). Биобанк NMNH (США), входящий в состав Нацио-

нального музея естественной истории в Вашингтоне, считается одним из крупнейших музейных биохранилищ образцов естественной истории. В настоящее время его емкость превышает 42 млн криообразцов. Frozen Ark (Великобритания): это международный проект, организованный на базе нескольких десятков исследовательских лабораторий, в которых хранится замороженный клеточный материал редких и вымирающих видов. San Diego Zoo's Frozen Zoo (США) — это биобанк, который содержит замороженные образцы тканей и клеток от различных видов животных из зоопарка Сан-Диего. Он используется для исследований, сохранения видов и программ разведения. Copenhagen Zoo's Genome Bank (Дания) — это биобанк, который содержит генетические образцы различных видов животных из Копенгагенского зоопарка. Он используется для исследований в области консервации и генетики животных. National Resource Center for Non-Human Primates (США) — это биобанк, который содержит широкий спектр образцов от обезьян и других приматов. Он предоставляет исследователям доступ к материалам для исследования различных аспектов поведения, здоровья и генетики приматов. Примером крупного биобанка на территории Российской Федерации может служить УНУ “Банк генетического материала

Таблица 1. Список биобанков, входящих в EUGENA (European Genebank Network for Animal Genetic Resources) по данным на 2023 г.

Название	Страна	Год вступления в EUGENA	Число образцов	Число видов	Число пород
CGN	Голландия	2018	547886	11	154
AREC Raumberg-Gumpenstein	Австрия	2017	421389	4	46
MCB Sp. z o. o.	Польша	2022	382055	1	8
INIAV	Португалия	2023	265929	6	40
Temerin	Сербия	2018	261133	1	3
BNGA	Испания	2019	107066	6	66
NBBM	Польша	2019	54215	3	12
NCBGC	Венгрия	2022	18757	10	31
GB NPPC-VÚŽV	Словакия	2021	4250	5	15
LBTU	Венгрия	2021	3318	5	6
IMGGE	Сербия	2021	1788	3	14
IAH	Сербия	2023	1109	4	14
SVCVP	Сербия	2018	585	1	1
UMo, BTF	Черногория	2017	568	3	8

Таблица 2. Примеры биобанков, хранящих различные типы замороженного биоматериала животных

Название	Число образцов	Число видов	Страна
National Museum of Natural History	4200000	18000	США
National Animal Germplasm Program	1281819	40	США
Frozen Ark	48000	5500	Великобритания
BioBankSA	80000	500	ЮАР
Australian Frozen Zoo	50000	298	Австралия
The National CryoBank	30000	—	Канада
Conservation Genome Resource Bank for Korean Wildlife	13475	407	Корея
San Diego Zoo's Frozen Zoo	11000	1300	США
Kunming Wild Animal Cell Bank	1455	289	Китай
УНУ “Банк генетического материала домашних и диких видов животных и птицы” ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста	200000	22	РФ

домашних и диких видов животных и птицы” ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста, в котором хранится коллекция ткани и ДНК более 200000 животных различных видов и на основе которого проводятся масштабные популяционно-генетические исследования животных (Абдельманова и др., 2021; Харзинова и др., 2022). На базе Московского зоологического парка создан криобанк для сохранения генетических ресурсов редких видов животных в целях получения потомства методом искусственного оплодотворения, для изучения особенностей репродукции и морфофизиологических характеристик гамет и эмбрионов, изучения и сохранения генетического разнообразия (Максудов и др., 2014; Maksudov et al., 2009).

Все типы биообразцов хранятся в биобанке в течение длительного, но ограниченного времени. В традиционных биобанках образцы хранятся в больших морозильных камерах и других хранилищах до тех пор, пока не понадобятся. В 1998 г. в рекомендациях было предложено собирать и хранить в генных банках эффективную популяцию из 50 неродственных видов животных для каждой породы, что позволило бы обеспечить средний уровень инбридинга в 1% на поколение при восстановлении (Blackburn, 2018). Для хранения в биобанках максимально неродственных видов животных обычно отбирают образцы путем генетического анализа. Наиболее распространенным методом является сравнение генетического кода с помощью полиморфных маркеров, таких как микросателлиты (STR) или

SNP-маркеры. Данные исследования позволяют определить степень родства между животными и выбрать наиболее неродственные особи для хранения в биобанке. Также важным критерием при отборе животных является их генетическое разнообразие, поэтому предпочтение отдается особям с наиболее уникальным генотипом. В популяционно-генетических исследованиях животных наиболее часто используются образцы крови, тканей, волосные фолликулы, сперма, молоко, фекалии, перья и изредка соскобы буккального эпителия (Muller et al., 2016). Подробнее рассмотрим различные типы биоматериала и особенности их хранения, транспортировки и выделения из них ДНК.

ХРАНЕНИЕ БИОМАТЕРИАЛОВ

Для хранения жидких образцов необходимо наличие специальных морозильных камер, которые способны поддерживать заданные параметры (-20°C , -80°C , -196°C), однако они занимают много пространства и потребляют значительное количество энергии, что совместно с выбросом тепла и трудностью переработки фреона делают данный способ наименее экологичным. Зачастую трудно учесть все сопутствующие издержки. Резервные морозильные камеры, генераторы, круглосуточное дежурство персонала, техническое обслуживание, безопасность, управление качеством и кондиционирование воздуха — лишь некоторые из затрат, связанных с хранением биообразцов в морозильном оборудовании.

довании (Muller et al., 2016). Забор крови путем венепункции требует своевременной обработки путем центрифугирования и разделения на аликвоты, что весьма время- и трудозатратно (McClendon-Weary et al., 2020). В качестве альтернативного метода хранения биообразцов, который является экономически эффективным и логистически привлекательным, следует отметить организацию хранения образцов при температуре окружающей среды (Lou et al., 2014; Muller et al., 2016). Способность стабилизировать биообразцы при температуре окружающей среды в течение продолжительных периодов времени может представлять эксплуатационные преимущества как при длительном хранении, так и при транспортировке образцов. Одной из проблем биобанков является резервное копирование образцов в географически отдельное место, чтобы снизить риск повреждения морозильной камеры при форсмажорных обстоятельствах. Возможность создания резервных образцов, хранящихся при комнатной температуре, может снизить потребность в дополнительных площадях при организации хранения. Однако при общей привлекательности организации хранения образцов при температуре окружающей среды существует острая потребность в технологиях по стабилизации длительного хранения образцов и нуклеиновых кислот, которые обеспечивают экономичное и простое хранение биологических образцов при температуре окружающей среды и не требуют соблюдения холодовой цепи при транспортировке и сложных протоколов восстановления образцов (Lou et al., 2014; Muller et al., 2016).

Хранение тканей можно осуществлять в высушенном виде в комнатных условиях в отдельных вентилируемых упаковках для избежания роста грибов и бактерий. Данный способ оказывает минимальное негативное воздействие на внешнюю среду, однако деградация ДНК происходит достаточно быстро, а процесс выделения ДНК из сухой ткани более трудоемкий и длительный, чем для, например, крови. Для наилучшей сохранности ДНК оптимально как можно быстрее замораживать полученный материал, так как хранение при температуре выше 4°C в течение нескольких дней лишает исследователей возможности выделить полноценную ДНК из проб (Al-Griw et al., 2017). Фиксация в спирте позволяет осуществить транспортировку образцов ткани при комнатных температурах без предварительного высушивания, однако дальнейшее хранение оптимально проводить в холодильном оборудовании. Перед выделением нуклеиновых кислот материал требует тщательной сушки от спирта, однако лизис происходит быстрее, чем

с высушенными образцами. В животноводстве сейчас набирает популярность метод одномоментного маркирования ушными бирками и сбора ткани из места прокола в стерильную номерную пробирку с консервантом, что позволяет избежать контаминации, ошибок маркирования и быстрой деградации биоматериала (Бекетов и др., 2024). В зависимости от типа консерванта такие пробы можно хранить при комнатной температуре от одной недели до одного месяца.

Менее инвазивным и более бережным по отношению к домашним животным является использование соматических клеток молока для получения генетического материала. Стандартными методами из молока не удастся получить достаточное количество ДНК для геномных исследований, лишь для амплификации митохондриальных генов или коротких микросателлитных локусов. Поэтому требуется модификация традиционных протоколов выделения предварительным центрифугированием большого объема молока (12–14 мл) при отборе достаточного количества клеток для последующего получения 12–45 нг/мкл ДНК (Liu et al., 2014). В настоящее время существуют наборы, позволяющие хранить молоко при комнатных условиях месяц до момента выделения ДНК (Norgen's Milk DNA Preservation and Isolation Kit).

Для племенных животных в качестве биоматериала успешно используется сперма. Уникальная упаковка ДНК сперматозоидов делает их устойчивыми к методам выделения ДНК, применяемым для соматических клеток. Во всех существующих протоколах для получения доступа к ДНК сперматозоидов используется комбинация трех компонентов: детергенты и/или хаотропные соли для облегчения лизиса клеток; протеиназа К для переваривания ядерных белков; восстановители для разрушения дисульфидных связей между протаминами (Wu et al., 2015). В целом для выделения ДНК из спермы животных подходят традиционные коммерческие наборы, такие как Chelex-100 (Bio-Rad, USA) и DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, USA). Первый позволяет получить более высокие концентрации ДНК, а колонки второго успешнее очищают от загрязнений (Silva et al., 2014).

В качестве источника нуклеиновых кислот благодаря легкости сбора зачастую предпочтение отдается волосным фолликулам, которые имеют преимущества хранения сухих биоматериалов, однако количества и качества получаемой ДНК достаточно лишь для микросателлитного анализа и генотипирования по нескольким десяткам SNP. Для получения более высоких концентраций ДНК требуется использовать

не менее 40 фолликулов и хранить их при 4°C (Gurau et al., 2021).

При изучении диких животных, не являющихся объектом промысла, получение биоматериала непосредственно от индивида зачастую невозможно. В подобных случаях одним из вариантов является сбор фекалий, которые можно фиксировать в спирте или высушивать для транспортировки. Процедура выделения ДНК из образцов фекалий весьма трудозатратна, выход и качество ДНК крайне низкие при высоком уровне контаминации. Полученная таким образом ДНК может быть использована лишь для ограниченного числа экспериментов, не требующих большого ее количества и сохранности цепей, таких как, например, микросателлитный анализ. Однако для некоторых STR-локусов все равно требуется синтез альтернативных праймеров, чтобы обеспечить амплификацию сильно деградированной ДНК в пределах 100–150 п. н. (Dimsoski et al., 2017).

Транспортировка образцов

Для популяционно-генетических исследований вопрос получения и транспортировки образцов имеет особое значение. В условиях экспедиции и полевой работы зачастую нет доступа к постоянному источнику электропитания, что делает невозможным соблюдение необходимого температурного режима. Кроме того, может не соблюдаться оптимальный для сохранения целостности проб промежуток времени между сбором, хранением и анализом, что снижает достоверность данных (Fouts et al., 2020).

Определенные трудности при работе с животными, особенно дикими, заключаются непосредственно в получении биоматериалов, поскольку далеко не каждое животное позволит человеку приблизиться и, тем более, взять пробы. Для дистанционного сбора образцов тканей животных используют дистанционный ветеринарный инъектор или арбалет, снабженные дротиком с биопсийной иглой. При попадании в животного биопсийная игла вырезает кусочек кожного покрова, затем она выпадает самостоятельно или ее выдергивают за привязанный к дротику тросик (Spasskaya et al., 2022). Животные, добытые охотниками или с использованием ловушек, а также пробы, полученные при помощи чесалок для сбора шерсти на местах проходов животных (тропы, выходы из нор и т. п.) и местах маркирования участков обитания у территориальных видов, могут быть полезным ресурсом для исследования генофондов диких животных (Yu et al., 2007; Sintasath et al., 2009; Curry et al., 2011; Aston et al., 2014).

Для сохранения нуклеиновых кислот подходят определенные способы фиксации: наиболее часто применяется 96%-ный этиловый спирт или сушка образцов. Для предотвращения свертывания крови используют специальные вакуумные пробирки с нанесенными на стенки К2 или К3 солями ЭДТА, связывающими ионы кальция, однако без холодильного оборудования гемолиз будет лишь отложен на 24 ч. Жидкие образцы крови, слюны и других биологических жидкостей в полевых условиях легко нанести на узкую стекловолоконную мембрану, высушивать в течение 1–2 ч без необходимости использования специального оборудования и затем транспортировать в лаборатории в бумажном конверте почтой или курьерской службой (Samsonova et al., 2022). Данный способ не требует соблюдения особого температурного режима, пробы занимают мало места и долго хранятся. Для снижения риска деградации нуклеиновых кислот возможно применение мембранных материалов предварительно обработанных ингибиторами нуклеаз и другими консервантами. Например, коммерческие FTA-карты (Flinders Technology Association) содержат реактивы для лизиса клеток, денатурации белков и защиты нуклеиновых кислот от нуклеаз, окисления и разрушения УФ-излучением. Также возможно использование бактерицидных и фунгицидных агентов для предотвращения контаминации образцов.

Сообщается о положительном опыте выделения ДНК животных из сухих пятен крови (Fowler et al., 2012; Samsonova et al., 2022), молока (Venkatesh, Gopal, 2018) и гомогената насекомых (Desloire et al., 2006) и проведения генетических исследований через несколько лет хранения таких образцов на целлюлозных картах при температуре окружающей среды. Представлен также (Miller et al., 2013) подход к сбору и хранению сухих образцов ДНК насекомых на мембранном носителе при комнатной температуре, при котором стабильность хранения таких образцов составляла не менее двух лет. Анализ опубликованных работ, в которых затронуты различные аспекты по транспортировке и хранению сухих пятен биологических жидкостей животных, показал, что в большинстве случаев высушенные образцы с целевыми аналитами можно транспортировать в лабораторию в условиях окружающей среды или даже при повышенной температуре (37°C) без потери стабильности в течение как минимум 7 дней, впрочем, нередко такие образцы могут храниться гораздо дольше (Samsonova et al., 2022). Однако, как отмечают некоторые авторы, влажность, вероятно, является наиболее критическим параметром в момент сбора и при хранении высушенных образцов, в

том числе для генетических исследований (Love Stowell et al., 2018). В любом случае сухое хранение необходимо не только для устойчивости целевого анализита в сухой пробе, но также для предотвращения заплесневения и потенциального загрязнения мембраны/образца. И в этом отношении перспективным является использование носителей биопроб из ненатуральных материалов, например, из полимерных или стеклянных волокон, слабо подверженных биоразложению.

Использование технологии сухих пятен крови для хранения биологического материала и проведения генетических исследований

Технология сухих пятен крови (СПК, от англ. — Dried Blood Spots, DBS) имеет множество преимуществ по сравнению с другими способами хранения крови благодаря сокращению времени и оборудования, необходимого для сбора образцов, а также простоте обработки, хранения и транспортировки (McClendon-Weary et al., 2020). Кроме того, малый объем отбираемого образца делает этот метод привлекательным в случаях, когда он ограничен, например, у новорожденных или небольших животных. Использование фильтровальной бумаги или специальной стекловолоконной мембраны позволяет осуществлять забор капиллярной крови без венепункции, быстро высушивать образцы и хранить их в небольшом объеме при разной T — от комнатной до 80°C . Данный способ широко применяется в медицинских исследованиях, в частности, для выявления инфекционных и наследственных заболеваний, однако перспективы метода в популяционно-генетических исследованиях недооценены (Carpentieri et al., 2021). При этом образцы ДНК, отобранные, например, в ходе эпидемиологических исследований, могут быть стабильными на фильтровальной бумаге в течение многих лет и десятилетий при хранении в сухих условиях (Chaisomchit et al., 2005; Gauffin et al., 2009). Выделение ДНК из сухих образцов можно осуществлять как с использованием экспресс-протоколов, при которых после краткого температурного лизиса (при 70 – 95°C в течение 5 – 15 мин) пробы можно сразу использовать для постановки ПЦР (Экспресс-ДНК-био, ООО “Алкор Био-М”, Москва; Гордиз Спринт, ООО Гордиз, Москва и др.), так и с применением стандартных протоколов для жидкой крови или сухих пятен (метод солевого переосаждения, фенол-хлороформный, сорбции на магнитных и стекловолоконных носителях, спин-колонок и др.). Процедура экстракции нуклеиновых кислот из высушенных на мембранном носителе образцов может потребовать оптимизации для

выделения как можно более высокого уровня экстрактанта, поскольку каждый метод имеет свои преимущества и недостатки (Ali et al., 2017). Оптимизация выделения нуклеиновых кислот, например, описана для протоколов экстракции ДНК/РНК из клещей (Desloire et al., 2006), из СПК собак (Tani et al., 2008), из высушенной ткани головного мозга (Sakai et al., 2015) и из СПК человека (Molteni et al., 2013; Kumar et al., 2019). Методы быстрого выделения часто используются для проведения микросателлитного анализа, так как в дальнейшем нет необходимости нормировать и разбавлять полученную ДНК. Однако подобные методы не подходят для чувствительных к качеству, количеству и чистоте ДНК протоколов секвенирования и полногеномного анализа (Steinberg et al., 2002), что нужно иметь в виду при планировании структуры банка биоматериалов и ДНК. Было показано, что из СПК, отобранных в ходе неонатального скрининга и десятилетиями хранившихся в архиве, возможно получение полногеномных (WGS) и полноэкзомных (WES) секвенированных последовательностей, совпадающих с последовательностями ДНК из свежеполученной крови того же индивида с частотой ошибок не более 1.5% . Из сухих образцов, 27 лет хранившихся при $T = -20^{\circ}\text{C}$, успешно выделяли ДНК и проводили полногеномную амплификацию с последующим анализом однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) (Hollegaard et al., 2013). Появление коммерчески доступной полимеразы Phi29 и наборов для изотермической амплификации с множественным замещением (MDA) значительно расширило возможности использования небольших количеств ДНК для полногеномных исследований (Sjöholm et al., 2007). Отмечено, что целлюлозные карточки являются удобным инструментом для длительного хранения архивных образцов в обычных условиях окружающей среды для последующего выделения ДНК и РНК, однако, для оптимальной производительности при хранении таких образцов необходимо поддерживать низкую относительную влажность (Smith, Burgoyne, 2004; Owens, Szalanski, 2005; Lou et al., 2014; Muller et al., 2016). Описано использование высушенных на мембранах биообразцов для сбора, архивирования и хранения генетического материала млекопитающих и насекомых (Smith, Burgoyne, 2004; Owens, Szalanski, 2005; Lall et al., 2010; Miller et al., 2013). Так, например, после хранения образцов пятен крови птиц на FTA-картах при комнатной T (от 18 до 43°C) в течение 44 месяцев из них была успешно выделена ДНК и амплифицирован ILRC-локус (Smith, Burgoyne, 2004). Разнообразные высушенные на мембранных носителях образцы биологических

жидкостей и тканей животных нашли применение в исследованиях популяционной генетики как удобный инструмент для сбора и исследования образцов. Многочисленные примеры такого использования обобщены в недавно опубликованном обзоре по использованию технологии СПК для ветеринарного применения и биологических исследований (Samsonova et al., 2022).

ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ РАЗЛИЧНОГО БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

Одним из важных аспектов создания биобанка ДНК является качественное выделение нуклеиновых кислот. Высокая концентрация ДНК и отсутствие примесей белков и остатков смесей буферов и спиртов, используемых в процессе выделения, напрямую зависят от выбранного метода экстракции. В настоящее время в качестве наиболее распространенных методов используются: метод переосаждения, метод с использованием сорбента или магнитных частиц, колоночный метод (Лубенникова и др., 2020). Для всех методов характерны основные этапы выделения нуклеиновых кислот: лизис образцов, во время которого происходит разрушение клеточных мембран и белков за счет внесения в раствор буфера для лизиса клеток, содержащих детергенты и хаотропные агенты, и фермента протеиназы (Антонова и др., 2010). Процесс лизиса образцов может отличаться в зависимости от используемого биологического материала, а также его подготовки. Так, если для крови достаточно 15–60 мин лизиса образцов при температуре 56–60°C, то для мездры, мышечных тканей, пантов может потребоваться оставить образцы в термостате на ночь с понижением температуры до 37°C для более успешного разрушения клеточных структур.

Рядом авторов отмечается высокий выход и чистота полученных образцов ДНК при выделении методом переосаждения, а также коммерческим колоночным набором QIAamp® Blood Mini Kit (Chacon-Cortes, Griffiths, 2014; Schiebelhut et al., 2017). Тем не менее стоит отметить, что при выделении с помощью метода переосаждения ДНК требуется высокая квалификация сотрудника лаборатории и опыт работы рутинными методами, так как при данном методе наблюдаются высокие временные затраты, а также вероятность удалить осажденные нуклеиновые кислоты при неаккуратной работе. Одним из несомненных плюсов является низкая стоимость реактивов. В сравнении с этим коммерческие методы позволяют сократить время работы с большим количеством материала, а также снижают влияние человеческого фактора. Таким образом, необходимо проведение соб-

ственных исследований по сравнительному анализу наборов, представленных на территории России. Метод выделения на магнитных частицах показывает умеренные значения, как чистоты, так и концентрации ДНК, и является одним из наиболее простых методически. Возможно варьирование результатов в зависимости от материала и выбранного коммерческого набора. Колоночный метод по мнению авторов статьи (Schiebelhut et al., 2017) наиболее благоприятен для выделения ДНК из тканей, при выделении из крови показаны более низкие значения концентрации, но тем не менее с удовлетворительной чистотой выделенных образцов (табл. 3).

Особым случаем является выделение ДНК из древних биоматериалов. Палеонтологические и археологические образцы содержат очень малые количества ДНК, которая обычно сильно фрагментирована. Поэтому от качества экстракции ДНК (число аутентичных матриц, отсутствие контаминации и примесей) зависит успешность дальнейшего молекулярно-генетического анализа (Григоренко и др., 2009). Как правило, геномную ДНК выделяют из костного порошка, полученного из зубов. Перед получением порошка зубы извлекают из черепов, обрабатывают перекисью водорода и облучают под ультрафиолетовым светом (254 нм). ДНК экстрагируют из порошка дентина с помощью коммерческих наборов Prep Filer™ BTA Forensic DNA Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., США), QIAamp DNA Investigator Kit (Qiagen, США) или COrDIS Extract decalcine (ООО «ГОРДИЗ», Россия) (Андреева и др., 2022).

Таким образом успешность эффективного использования биобанка зависит от используемых методов выделения. Качество и возможности биобанка зависят от правильно выбранного типа биоматериала, используемого для формирования банка, с учетом возможностей, предоставляемых современными методами выделения. Тем не менее требуется более подробный анализ представленных на рынке коммерческих наборов и их успешность при применении для различного биологического материала.

Хранение и контроль качества выделенной ДНК

Минимизировать риски, связанные с деградацией биоматериала, позволяет хранение изолированной ДНК. Очищенная ДНК, хранящаяся в жидкой фазе, может подвергаться деградации под воздействием множества факторов: воды, УФ-излучения, озона, кислорода, метаболитов и различных сопутствующих загрязнений (например, следы ионов металлов, липидов и полифенолов). Эти факторы приводят к таким

Таблица 3. Эффективность методов выделения по четырем критериям (где наибольший балл означает наилучшую эффективность)

Метод	Выход ДНК	Чистота	Эффективность ПЦР	Стоимость	Среднее значение
Фенол-хлороформ	1	0.97	1	0.27	0.81
PAL1 (набор Fiber Plate DNA Extraction)	0.61	0.66	0.83	0.81	0.73
TKFS (магнитные частицы)	0.58	0.97	0.95	0.4	0.72
QIAG (Qiagen DNeasy™) колонки	0.58	0.5	1	0.44	0.63
PMAX — Promega Maxwell®	0.33	0.5	0.91	0	0.58

Примечание: выход ДНК — это среднее количество нг ДНК/мг ткани, где максимальное значение равно 1. Чистота представлена как доля образцов с минимальным количеством примесей, определенных соотношением A260/280 $\geq$ 1.80, а эффективность — как доля образцов, которые амплифицировались в ходе ПЦР. Стоимость — это разница единицы и стоимости в долларах на образец. Среднее значение пропорционально средней оценке по четырем критериям для каждого метода (по: Schiebelhut et al., 2017).

повреждениям ДНК, как депуринизация (основной процесс деградации), депиримидинирование и деаминирование, окисление оснований или сахаров, сшивание цепей и одноцепочечные разрывы ДНК, которые представляют собой серьезную угрозу сохранности ДНК. Некоторые из этих факторов являются источником ошибок, которые в конечном итоге проявляются в ходе секвенирования и амплификации, обычно используемых в ДНК-анализе (Lindahl, 1993).

В образцах крови концентрация выделяемой ДНК падает в среднем на 3–5% в год, в то время как непосредственно растворы хорошо очищенной и концентрированной ДНК могут храниться при $T < -32^\circ\text{C}$ без снижения ее качества и количества (Скирко и др., 2020; Калинин и др., 2022). Также одним из плюсов является меньший объем, занимаемый в морозильном оборудовании пробирками с ДНК (0.2–1.5 мкл) по сравнению с пробирками для крови (4–8 мл). Выбор контейнера оказывает существенное влияние на стоимость хранения одного образца. ДНК может храниться как в пробирке объемом 200–300 мкл, так и объемом 1.5–2 мл, что увеличивает стоимость хранения как минимум в 3 раза просто потому, что контейнер занимает больше места в морозильном оборудовании (Muller et al., 2016).

Хранение выделенной ДНК можно осуществлять при различных условиях. Основным режимом считается хранение при низких температурах, однако возможно сохранить ДНК в высушенном виде в присутствии стабилизаторов или в виде пятен на бумаге/стекловолоке при

комнатной температуре (Muller et al., 2016). Длительное хранение экстрагированных образцов ДНК рекомендуется осуществлять при -80°C или -196°C (жидкий азот). Для оценки качества и количества ДНК широко используется электрофоретическое разделение в геле совместно с маркерами молекулярного веса (данные о длинах и концентрации фрагментов указываются производителями). Визуализация образца в высокомолекулярной области (>30 тыс. п.н.) без “шмера” (от англ. “smear” — пятно, мазок; окрашивание по всей длине геля без четкой полосы) свидетельствует о его высокой сохранности. Для мономолекулярного секвенирования на платформе PacBio рекомендуется использовать ДНК с размером >100 тыс. п.н., визуализировать которую возможно с помощью пульс-электрофореза, фракционирующего высокомолекулярные фрагменты ДНК от 10 000 п.н. до 10 млн п.н. в условиях периодически меняющегося по направлению (пульсирующего) электрического поля (Chef-DR II System, Bio-Rad) или автоматизированного источника импульсного поля (Femto Pulse system, Agilent), позволяющего разделять фрагменты ДНК длиной до 165 кб.

Чистоту и концентрацию ДНК в образцах можно оценить с использованием спектрофотометра, в том числе в микрообъемах (например, NanoDrop — 1–2 мкл) (Долудин и др., 2020). Однако более достоверные данные о концентрации можно получить с помощью флуориметра (Qubit), позволяющего оценить исключительно концентрацию двуцепочечных нуклеиновых кислот без влияния загрязнений. Принимая во

внимание, что риски ошибок генотипирования деградированной ДНК уменьшаются с увеличением количества ДНК хорошего качества (Arandjelovic et al., 2020), пригодными для проведения исследований микросателлитов считаются препараты ДНК, имеющие концентрацию дцДНК не менее 1 нг/мкл, соотношение A260/A280 в пределах 1.6–2.0 и A260/230 = 1.5–2.6; для проведения исследований по SNP-маркерам — не менее 3 нг/мкл, 1.8–2.0 и 1.5–2.6, соответственно. Для проведения полногеномного секвенирования требования к исходному материалу еще выше — концентрация ДНК не менее 10–15 нг/мкл, соотношение OD260/OD280 в диапазоне 1.8–2.0 и A260/230 = 1.5–2.6, длины фрагментов от 30 кб.

МАРКИРОВАНИЕ И КАТАЛОГИЗАЦИЯ ХРАНЯЩИХСЯ В БАНКЕ ОБРАЗЦОВ

Маркировка образцов биоматериала животных в биобанке является важной процедурой, которая позволяет однозначно идентифицировать и отслеживать каждый образец в хранилище. Маркировка образцов обеспечивает точность и надежность их идентификации, что является критическим для правильной работы биобанка. Вот несколько методов маркировки образцов биоматериала животных в биобанке (Загоровская, 2013):

1. Штрихкоды являются одним из наиболее распространенных методов маркировки образцов. Каждому образцу присваивается уникальный штрихкод, содержащий информацию о нем. Штрихкоды могут быть нанесены на этикетки, которые прикрепляются к контейнерам с образцами, или непосредственно нанесены на сами контейнеры.

2. RFID-метки (Radio Frequency Identification) — это технология, которая позволяет бесконтактно идентифицировать и отслеживать образцы. Каждый образец оборудуется специальной RFID-меткой, которая содержит информацию о нем. С помощью радиочастотных считывателей можно легко определить местонахождение образца и получить доступ к его описательным данным.

3. QR-коды (Quick Response) представляют собой двухмерные штрихкоды, которые могут содержать большой объем информации. Они могут быть использованы для маркировки образцов, аналогично штрихкодам. QR-коды могут быть отсканированы с помощью мобильных устройств или специальных сканеров для получения доступа к информации о каждом образце.

4. Уникальные номера: каждому образцу может быть присвоен уникальный номер или код,

который позволяет его идентифицировать. Этот номер может быть записан на этикетках или нанесен на контейнеры образцов.

Требования к маркировке образцов определяются условиями и продолжительностью их хранения. Наиболее серьезные требования предъявляются к криоэтикеткам. Помимо стойкости к перепаду температур, их адгезивный слой и печатная поверхность должны быть устойчивы к действию конденсата, растворителей, а также механическому истиранию. Производителями лабораторного оборудования предлагаются этикетки и принтеры, специально разработанные для маркировки образцов для криохранения. Они поддерживают высокое качество маркировки на протяжении всего периода хранения. Их стоимость составляет около 150–250 руб. (1.6–2.7 \$) в расчете на одну пробирку (Cryo-DirectTAG™, NitroTAG™, Thermo Scientific). Специализированные для биобанкирования материалы и средства печати маркировки не всегда доступны, и могут требовать существенных затрат при реорганизации имеющихся биобанков, содержащих тысячи образцов. Альтернативой является подбор материалов и методов печати этикеток с учетом условий хранения и особенностей контейнеров (криопробирок). Высокие требования к маркировке предъявляются в некоторых производственных сферах, а соответствующие материалы имеют спецификацию. Например, этикетки с подходящими параметрами используются для идентификации кабелей на Крайнем Севере, а также при хранении замороженных продуктов. В большинстве областей используют термо- и термотрансферные этикетки. Термоэтикетки изготавливаются на основе целлюлозы и пропитки, темнеющей при нагревании. Они неустойчивы к действию влаги и истиранию, поэтому могут применяться только для кратковременной маркировки образцов. На термотрансферных этикетках отпечатка данных происходит с помощью нагрева термоголовкой принтера красящей ленты (риббона). Они существенно долговечней и могут изготавливаться из устойчивых материалов, в том числе синтетических полимеров. Известно, что одинаковые или близкие по химической природе материалы обеспечивают наиболее надежный контакт при склеивании. Так, например, для пластиковых пробирок типа эппендорф хорошо подходят виниловые этикетки с акриловым клеевым слоем. Размеры этикеток также подбирают исходя из типов пробирок. Дополнительную надежность фиксации можно получить при использовании этикеток, длина которых чуть больше внешней окружности пробирки, за счет склеивания внахлест. Высота этикеток должна быть удобной для их размещения на ровной (цилиндрической)

поверхности пробирки или другого контейнера. Например, исходя из этих требований, для упомянутых выше пробирок типа эппендорф подходят этикетки размером 12.5 × 32 мм. Криопробирки часто имеют независимо отделяющую крышку — маркировка на ней дублируется во избежание кросс-контаминации при отборе аликвот.

Каждому образцу в базе данных прикрепляются описательные данные, включающие в себя информацию о виде животного, месте и дате сбора, поле, возрасте и других характеристиках, которые могут быть полезными для анализа. Сложно переоценить важность подробных высококачественных фенотипических данных для полногеномных исследований. Также большой интерес представляет включение в каталог географической информации о местах сбора проб, позволяющей составлять карты ареала видов, выявления областей с высоким биоразнообразием и оценки влияния изменений окружающей среды на популяции; планировать природоохранные мероприятия, выявляя генетически различные популяции, которые могут требовать особых стратегий сохранения. Это позволяет специалистам по охране природы определять приоритетные области для охраны на основе генетического разнообразия и географического распределения, обеспечивая сохранение уникальных генетических линий внутри вида (Comizzoli, Wildt, 2017). Генетические данные могут дать представление о здоровье и жизнеспособности популяций, например, об уровне инбридинга, генетическом разнообразии и адаптивном потенциале (Spasskaya et al., 2022). Объединив эту информацию с данными географической привязки, исследователи могут отслеживать изменения в состоянии популяции с течением времени и оценивать эффективность мер по сохранению популяции. Интеграция геопривязанных и генетических данных имеет решающее значение для обнаружения инвазивных видов и понимания их распространения. Генетические данные помогут определить источник инвазивных популяций, а данные с привязкой к местности — отследить их перемещение и разработать стратегии управления, направленные на борьбу с их распространением. В случае изучения домашних видов животных интеграция с географическими информационными системами может быть использована для определения мест отбора проб и указания существующих возможных пробелов в точках сбора. Пространственная оценка покрытия и наполненности биобанка (Brazilian Germplasm bank) сведениями о популяциях различных пород овец в Бразилии позволила выявить нехватку образцов отдельных популяций и даже полное отсутствие некоторых

пород, а также закономерности изменения генетических дистанций в зависимости от удаленности от племенного ядра (McManus et al., 2021).

Задача системы каталогизации состоит в составлении и актуализации списка образцов и данных об их расположении в биобанке. Образцу присваивается номер, которому соответствуют запись в каталоге и положение в хранилище. Возможность быстро получить актуальную и достоверную информацию о местоположении образца определяет удобство и качество работы биобанка. Чем менее точна информация о положении образца, тем больше времени уходит на его поиск, на протяжении которого другие образцы подвергаются воздействию температурных колебаний и конденсата, а также риску контаминации. Актуализация данных о положении образца снижает риск его утраты, в особенности, при неоднократном доступе (Dagher G., Dagher A., 2018).

Положение образца в биобанке, а также его извлечение из хранилища можно отслеживать автоматически, например, с помощью сканера, считывающего маркировку с нижней части пробирок, расположенных в криоштативах с прозрачным дном, при каждом их помещении в холодильник (Henderson et al., 2019). Таким образом, подобное устройство вкупе с электронной таблицей на компьютере или планшете решает основную задачу автоматизации биобанка. Полностью роботизированные системы позволяют удаленно извлекать образцы, отправлять их на исследования и возвращать в хранилище, фиксируя результат манипуляций, например, количество циклов разморозки и остаточный объем образца (Linsen et al., 2020).

Программные и инженерные средства автоматизации для биобанков не являются типовым продуктом и имеют высокую стоимость, которая также формируется спросом в высокобюджетных областях медицины (Linsen et al., 2020). В то же время, в рутинной клинико-лабораторной практике также используются средства автоматизации, причем их первостепенная функция — отслеживание образцов, совпадает с главной задачей каталогизации в биобанках. Перемещение, анализ, оценка качества и измерение объема, отправка на хранение и извлечение образца — возможности таких систем, которые наиболее востребованы в биобанковании (Linsen et al., 2020). Средства автоматизации в клинических лабораториях появились раньше, чем в других биомедицинских областях, в настоящее время они востребованы и используются повсеместно, поэтому при невысокой стоимости могут иметь высокую надежность (Linsen et al., 2020). Однако

в них могут отсутствовать специализированные для биобанкирования функции.

Потребность в автоматизации возрастает с увеличением объема биобанка и частоты обращения к пробам. Вопросы удобства, экономической целесообразности и надежности электронных систем в сравнении с физическими каталогами остаются открытыми и заслуживают особого внимания в каждом конкретном случае. Рациональный выбор можно сделать при понимании достоинств и недостатков данных способов ведения биобанков. Так, для NAGP (National Animal Germplasm Program, США) потребовалось обновление программы базы данных в связи с добавлением новых видов животных, которое выявило необходимость в более гибкой и удобной для ученых конфигурации базы данных, в частности потому, что эти разнообразные виды и породы не имеют общей таксономической структуры (Irwin et al., 2012).

В автоматизированных системах образцы более сохранны за счет снижения колебаний условий хранения (Powell et al., 2019). В частности, ускорение поиска и манипуляций снижает “эффект пингвина” — неравномерного промерзания образцов в центре и по краям штатива. Автоматический учет существенно снижает риск утраты образцов (Powell et al., 2019). Несмотря на высокую стоимость, автоматизированные системы позволяют снизить некоторые затраты, прежде всего, за счет более компактного хранения образцов (Powell et al., 2019), что уменьшает число кельвинаторов и потребность в персонале.

К недостаткам автоматических систем можно отнести их требования к унификации материалов для хранения образцов. Большинство автоматизированных систем может работать не со всеми разновидностями пробирок, этикеток и криобоксов (Powell et al., 2019). Автоматизированные системы в большей степени требовательны к условиям энергоснабжения и квалификации персонала. Таким образом, помимо цены самой системы, эксплуатационные расходы и затраты на расходные материалы при автоматизации могут быть значительно выше, чем при ручном ведении биобанка. Таким образом, автоматизация наиболее актуальна при большом числе образцов одинакового типа, высокой стоимости и стабильности энергетических и человеческих ресурсов, длительном периоде хранения образцов и необходимостью неоднократного доступа к ним. Однако, даже самые большие биобанки могут управляться вручную как, например, национальные книжные библиотеки в доэлектрическую эпоху.

Каталогизация образцов в популяционно-генетических исследованиях животных помогает

создать базу данных, которая служит основой для проведения анализов, выявления генетических трендов, оценки уровня генетического разнообразия и принятия решений по сохранению популяций. Это важный инструмент для понимания генетической структуры животных и разработки мер по сохранению их биологического разнообразия. Широкий диапазон генетических ресурсов в коллекциях генных банков, полученных из различных условий, может помочь ускорить идентификацию генов или их комбинаций, которые позволят улучшить адаптацию, продуктивность и другие важные для человечества аспекты. Совместно с географическими информационными системами, высокопроизводительным генотипированием и высококачественным фенотипированием подобные коллекции могут служить источником для максимально информативных баз данных и для определения потенциала использования в зависимости от экологических или экономических факторов (Blackburn et al., 2024).

ЭТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ БИОБАНКИРОВАНИЯ В СФЕРЕ ГЕНЕТИКИ ЖИВОТНЫХ

Жизни человека и животных тесно связаны между собой. Это в особенности справедливо в отношении видов, к которым человек проявляет научный интерес. Популяционно-генетические исследования могут иметь значительные последствия как для людей, так и для животных. В современном мире существует разрыв между возрастающими техническими возможностями и знаниями, и не таким активным осмыслением влияния этого прогресса на другие сферы жизни и общечеловеческие ценности. Поэтому внимание к этическим аспектам биобанкирования значительно возрастает, и развитие соответствующей законодательной базы становится необходимостью (Smith, Johnson, 2021). FAO разработаны руководства, в которых рассматриваются вопросы физической структуры, минимальных людских ресурсов и потребностей в оборудовании (FAO Animal Production and Health Guidelines No. 12. 2012). Ответ страны на вышеперечисленные элементы и эти рекомендации — это вопрос национальной политики и поддержки деятельности генного банка фондами. В России практически отсутствует нормативная база в данной области по сравнению с другими развитыми странами (Малеина, 2020). Между тем формирование нормативно-правового поля для работы с биокolleкциями абсолютно необходимо в первую очередь по причине тесной связи биологических коллекций с понятием “национальные биологические ресурсы” (Каменский и др.,

2016). В случае отсутствия строгого правового регулирования, этическая оценка исследователя полностью определяет последствия его работы. Это особенно важно в странах с богатым биоразнообразием, включая Россию (Petrova, 2020).

В 2018 г. была основана Национальная Ассоциация биобанков и специалистов по биобанкированию (НАСБИО) в целях объединения специалистов и исследовательских центров для создания и развития сети биобанков России. В настоящее время идет работа по созданию Национальной информационной платформы биобанков РФ (НИПБ РФ), которая обеспечит доступ к информации о деятельности биобанков, их коллекциях, об условиях научного сотрудничества и предоставления биообразцов для исследований (Мешков и др., 2022). Такая информационная система может содержать данные географической информационной системы (ГИС) о месте сбора и хранения биоматериала, а также описания фенотипов и результаты генетического анализа. ГИС может быть использована для мониторинга распределения редких видов и популяций животных и планирования экспедиций по сбору образцов. С помощью биокolleкций с детальным описанием фенотипических данных возможно проведение исследований по выявлению генетических механизмов их формирования, а также поиску новых ассоциаций и маркеров. Биобанки содержат информацию о генетических вариациях, связанных с адаптацией к различным геоклиматическим условиям, резистентности и продуктивными качествами сельскохозяйственных животных. Эти данные представляют собой экономический ресурс, который может быть задействован при выведении новых пород, изменении климата, требований к продуктам питания и меняющимися вкусами потребителей (Adams, Getz, 2022).

Аборигенные (местные) породы животных часто играют важную роль в жизни связанных с ними этносов, например, в оленеводстве. Информация о генотипах этих животных может быть использована для сохранения популяции, поиска экономически ценных адаптивных качеств и создания пород с желаемыми свойствами (Rijal, Sharma, 2022). Однако такое использование данных может вызвать конфликты между частными и общественными интересами, а также затронуть автономию отдельных популяций людей. Так, например, создаваемые продуктивные породы составляют конкуренцию аборигенным животным, которые могут играть важную роль в жизни местного населения. Сам выбор объекта популяционно-генетического исследования несет в себе этическую нагрузку, так как влияет на распределение ограниченных ресур-

сов, направленных на сохранение видов и популяций, нуждающихся в этом (Johnson, 2020).

При создании биобанков ключевым фактором, определяющим возможности их использования для различных целей, является характеристика фенотипов животных. Например, описание продуктивных качеств создает возможность коммерциализации данных биобанка, а регистрация особенностей физиологии или поведения — основу для проведения фундаментальных научных исследований (Chen, Li, 2021).

Таким образом, при создании биобанка и определении условий его использования, необходимо провести анализ различных аспектов возможного применения содержащихся в нем генетических данных, в том числе экономического ресурса, а также их значения для сохранения аборигенных популяций и связанных с ними этносов, вопроса уважения их автономии, и приоритетности в выборе объекта популяционно-генетических исследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Оптимальная стратегия биобанкирования заключается в сохранении различных типов материалов для наиболее экологичного и рационального их использования. Сразу после доставки образцов от места сбора в лабораторию из части материала можно выделять высокомолекулярную и качественно очищенную ДНК и хранить ее при низких температурах в виде раствора с высокой концентрацией для самых чувствительных и сложных протоколов полногеномных исследований. Часть материала можно хранить в жидком аликвотированном виде в морозильных камерах, часть материала в виде жидкостей, либо суспензий можно наносить на мембранный носитель, высушивать и далее хранить при комнатной температуре и в холодильных установках. Создание дубликатов образца в виде материалов с различными условиями хранения поможет избежать утери в случае непредвиденных аварий в электросетях или катастроф. Таким образом, в зависимости от цели эксперимента и требований к материалу всегда можно подобрать оптимальный вариант пробы из банка биоматериалов. В настоящее время биобанки как источник генетической информации становятся универсальной платформой для многочисленных междисциплинарных исследований. Создание надежной унифицированной системы: хранения, обмена, исследования биообразцов или международной и отечественной индустрии биобанкирования, безусловно, имеет большое будущее в решении фундаментальной проблемы челове-

чества — сохранении и рациональном использовании биоразнообразия.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 22-76-10053).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов изучения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Абдельманова А.С., Форнара М.С., Бардуков Н.В. и др. Полногеномное исследование ассоциаций SNP с высотой в холке в популяциях локальных и трансграничных пород крупного рогатого скота в России // *Сельскохозяйств. биол.* 2021. Т. 56 (6). С. 1111–1122. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2021.6.1111rus>
- Андреева Т.В., Мальярчук А.Б., Сошкина А.Д. и др. Методологии выделения древней ДНК из костной ткани для геномного анализа: подходы и практические рекомендации // *Генетика.* 2022. Т. 58 (9). С. 979–998. <https://doi.org/10.31857/S001667582209003X> [Andreeva T.V., Malyarchuk A.B., Soshkina A.D. et al. Methodologies for ancient DNA extraction from bones for genomic analysis: approaches and guidelines // *Russ. J. Genet.* 2022. Т. 58 (9). С. 1017–1035.]
- Антонова О.С., Корнева Н.А., Белов Ю.В., Курочкин В.Е. Эффективные методы выделения нуклеиновых кислот для проведения анализов в молекулярной биологии (обзор) // *Науч. приборостроение.* 2010. Т. 20 (1). С. 3–9.
- Бекетов С.В., Семин М.Т., Мокеев А.С. и др. Перспективы применения технологии “генетического биркования” в животноводстве // *Главн. зоотехник.* 2024. № 5. С. 3–15. <https://doi.org/10.33920/sel-03-2405-01>
- Григоренко А.П., Боринская С.А., Янковский Н.К., Рогаев Е.И. Достижения и особенности в работе с древней ДНК и ДНК из сложных криминалистических образцов // *Acta Naturae* (русскоязычная версия). 2009. № 3. С. 64–76.
- Долудин Ю.В., Лимонова А.С., Козлова В.А. и др. Сбор и хранение ДНК-содержащего биоматериала и выделенной ДНК // *Кардиоваскул. терапия и профилактика.* 2020. Т. 19 (6). С. 2730. <https://doi.org/10.15829/1728-8800-2020-2730>
- Загоровская В. Этикетка. Современные решения // *Мясная сфера.* 2013. № 6 (97). С. 58–59.
- Калинин Р.С., Голева О.В., Илларионов Р.А. и др. Формирование биобанка в структуре научных и лечебно-диагностических учреждений и перспективы межрегиональной интеграции // *КВТиП.* 2022. № 11. <https://doi.org/10.15829/1728-8800-2022-3401>
- Каменский П.А., Сазонов А.Э., Федянин А.А., Садовничий В.А. Биологические коллекции: стремление к идеалу // *Acta Naturae* (русскоязычная версия). 2016. № 2 (29).
- Лубенникова М.В., Афанасьев В.А., Афанасьев К.А. Выделение ДНК — важный этап молекулярно-генетического исследования // *Электрон. науч.-метод. журн. Омского ГАУ.* 2020. № 2. С. 4.
- Максудов Г.Ю., Иванов А.В., Малев А.В., Гильмутдинов Р.Я. Вспомогательные репродуктивные технологии как инновационный тренд сохранения биоразнообразия // *Мат. междунар. науч.-практ. конф. “Биотехнология и качество жизни”.* М.: Экспо-биохим-технологии, 2014. С. 407–408.
- Малеина М.Н. Правовой статус биобанка (банка биологических материалов человека) // *Право. Журн. ВШЭ.* 2020. № 1.
- Мешков А.Н., Ярцева О.Ю., Борисова А.Л. и др. Концепция национальной информационной платформы биобанков Российской Федерации // *Кардиоваскул. терапия и профилактика.* 2022. Т. 21 (11). С. 3417. <https://doi.org/10.15829/1728-8800-2022-3417>
- Скирко О.П., Мешков А.Н., Ефимова И.А. и др. Срок хранения образцов цельной крови в биобанке и выход выделенной из нее дезоксирибонуклеиновой кислоты при проведении генетических исследований // *Кардиоваскул. терапия и профилактика.* 2020. Т. 19 (6). С. 2726. <https://doi.org/10.15829/1728-8800-2020-2726>
- Харзинова В.Р., Акопян Н.А., Доцев А.В. и др. Генетическое разнообразие и филогенетические взаимосвязи пород свиней, разводимых в России, на основе анализа полиморфизма D-петли мтДНК // *Генетика.* 2022. Т. 58 (8). С. 920–932. <https://doi.org/10.31857/S0016675822080045>
- Adams J., Getz W.M. The economic value of genetic biodiversity in biobanks // *Ecol. Econom.* 2022. Art. 107358. <https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2021.107358>
- Al-Griw H.H., Zraba Z.A., Al-Muntaser S.K. et al. Effects of storage temperature on the quantity and integrity of genomic DNA extracted from mice tissues: a comparison of recovery methods // *Open Vet. J.* 2017. V. 7 (3). P. 239–243. <https://doi.org/10.4314/ovj.v7i3.7>
- Ali N., Rampazzo R.C.P., Costa A.D.T., Krieger M.A. Current nucleic acid extraction methods and their implications to point-of-care diagnostics // *Biomed. Res. Int.* 2017. Art. 9306564. <https://doi.org/10.1155/2017/9306564>
- Arandjelovic M., Guschanski K., Schubert G. et al. Two-step multiplex polymerase chain reaction improves the speed and accuracy of genotyping using DNA from noninvasive and museum samples // *Mol. Ecol. Resour.* 2009. V. 9 (1). P. 28–36. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2008.02387.x>
- Aston E.J., Mayor P., Bowman D.D. et al. Use of filter papers to determine seroprevalence of *Toxoplasma gondii* among hunted ungulates in remote Peruvian Amazon // *Int. J. Parasitol. Parasit. Wildl.* 2014. V. 3. P. 15–19. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2013.12.001>

- Blackburn H.D.* Biobanking genetic material for agricultural animal species // *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 2018. V. 15 (6). P. 69–82.
<https://doi.org/10.1146/annurev-animal-030117-014603>
- Blackburn H.D., Lozada-Soto E., Paiva S.R.* Biobanking animal genetic resources: critical infrastructure and growth opportunities // *Trends Genet.* 2024. V. 40. P. 115–117.
- Caenazzo L., Tozzo P.* The future of biobanking: what is next? // *BioTech.* 2020. V. 9. P. 23.
<https://doi.org/10.3390/biotech9040023>
- Carpentieri D., Colvard A., Petersen J. et al.* Mind the quality gap when banking on dry blood spots // *Biopreserv. Biobank.* 2021. V. 19 (2). P. 136–142.
<https://doi.org/10.1089/bio.2020.0131>
- Chacon-Cortes D., Griffiths L.R.* Methods for extracting genomic DNA from whole blood samples: current perspectives // *J. Biorep. Sci. Appl. Med.* 2014. P. 1–9.
<https://doi.org/10.2147/BSAM.S46573>
- Chaisomchit S., Wichajarn R., Janejai N., Chareonsiriwatana W.* Stability of genomic DNA in dried blood spots stored on filter paper // *Southeast Asian J. Trop. Med. Publ. Health.* 2005. V. 36 (1). P. 270–273.
- Chen Y., Li L.* Ethical considerations in biobanking and phenotyping animals for research purposes // *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 2021. V. 12. P. 1–11.
<https://doi.org/10.1186/s40104-021-00630-2>
- Comizzoli P., Wildt D.E.* Cryobanking biomaterials from wild animal species to conserve genes and biodiversity: relevance to human biobanking and biomedical research // *Biobanking of Human Biospecimens.* Cham: Springer, 2017. P. 217–235.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-55120-3_13
- Curry P.S., Elkin B.T., Campbell M. et al.* Filter-paper blood samples for ELISA detection of brucella antibodies in caribou // *J. Wildl. Dis.* 2011. V. 47. P. 12–20.
<https://doi.org/10.7589/0090-3558-47.1.12>
- Dagher G., Dagher A.* Automated biobanking: challenges and opportunities // *Biopreserv. Biobank.* 2018. V. 16 (3). P. 187–195.
<https://doi.org/10.1089/bio.2017.0067>
- De Souza Y.G., Greenspan J.S.* Biobanking past, present and future: responsibilities and benefits // *AIDS.* 2013. V. 27 (3). P. 303–312.
<https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e32835c1244>
- Desloire S., Moro C., Chauve C. and Zenner L.* Comparison of four methods of extracting DNA from *D. gallinae* (Acari: Dermatyssidae) // *Vet. Res.* 2006. V. 37. P. 725–732.
<https://doi.org/10.1051/vetres:2006031>
- Dimoski P.* Genotyping horse epithelial cells from fecal matter by isolation of polymerase chain reaction products // *Croat. Med. J.* 2017. V. 58 (3). P. 239–249.
<https://doi.org/10.3325/cmj.2017.58.239>
- FAO. Cryoconservation of animal genetic resources. FAO animal production and health guidelines No. 12. Rome: Food and Agriculture Organization of the UN, 2012.
- Fouts A.N., Romero A., Nelson J., Hogan M. et al.* Ambient biobanking solutions for whole blood sampling, transportation, and extraction // *Biochemical analysis tools — methods for bio-molecules studies* // *IntechOpen.* 2020.
<https://doi.org/10.5772/intechopen.91995>
- Fowler K.E., Reitter C.P., Walling G.A., Griffin D.K.* Novel approach for deriving genome wide SNP analysis data from archived blood spots // *BMC Res. Notes.* 2012. V. 5. P. 503.
<https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-503>
- Gauffin F., Nordgren A., Barbany G. et al.* Quantitation of RNA decay in dried blood spots during 20 years of storage // *Clin. Chem. Lab. Med.* 2009. V. 47 (12). P. 1467–1469.
<https://doi.org/10.1515/CCLM.2009.351>
- Groeneveld L.F., Gregusson S., Guldbrandtsen B. et al.* Domesticated animal biobanking: land of opportunity // *PLoS Biol.* 2016. V. 14 (7). P. e1002523.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002523>
- Gurau M.R., Cretu D.M., Negru E. et al.* Comparative analysis of total DNA isolation procedure from blood and hair follicle samples in goats // *Rev. Rom. Med. Vet.* 2021. V. 31 (4). P. 82–86.
- Henderson M.K., Goldring K., Simeon-Dubach D.* Advancing professionalization of biobank business operations: performance and utilization // *Biopreserv. Biobank.* 2019. V. 17 (3). P. 213–218.
<https://doi.org/10.1089/bio.2019.0005>
- Hollegaard M.V., Grauholm J., Nielsen R. et al.* Archived neonatal dried blood spot samples can be used for accurate whole genome and exome-targeted next-generation sequencing // *Mol. Genet. Metab.* 2013. V. 110. P. 65–72.
<https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2013.06.004>
- Irwin N., Wessel L., Blackburn H.* The Animal Genetic Resources Information Network (Animal GRIN) database: a database design and implementation case // *J. Inform. Syst. Educ.* 2012. V. 23. P. 19–27.
- Johnson L.A.* Ethical challenges in population genetics research // *J. Ethics.* 2020. V. 24. P. 405–423.
<https://doi.org/10.1007/s10892-020-09338-3>
- Kumar A., Mhatre S., Godbole S. et al.* Optimization of extraction of genomic DNA from archived dried blood spot (DBS): potential application in epidemiological research & bio banking // *Gates Open Res.* 2019. V. 2. P. 57.
<https://doi.org/10.12688/gatesopenres.12855.3>
- Lall G.K., Darby A.C., Nystedt B. et al.* Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of closely related wild and captive tsetse fly (*Glossina morsitans morsitans*) populations // *Parasit. Vectors.* 2010. V. 3. P. 47.
<https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-47>
- Lindahl T.* Instability and decay of the primary structure of DNA // *Nature.* 1993. V. 362. P. 709–715.
- Linsen L., Van Landuyt K., Ectors N.* Automated sample storage in biobanking to enhance translational research: the bumpy road to implementation // *Front. Med.* 2020. V. 6. P. 309.
<https://doi.org/10.3389/fmed.2019.00309>
- Liu Y.F., Gao J.L., Yang Y.F. et al.* Novel extraction method of genomic DNA suitable for long-fragment amplification from small amounts of milk // *J. Dairy Sci.* 2014. V. 97 (11). P. 6804–6809.
<https://doi.org/10.3168/jds.2014-8066>
- Lou J.J., Mirsadraei L., Sanchez D.E. et al.* A review of room temperature storage of biospecimen tissue and nucleic

- acids for anatomic pathology laboratories and biorepositories // *Clin. Biochem.* 2014. V. 47. P. 267–273.
<https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2013.12.011>
- Love Stowell S.M., Bentley E.G., Gagne R.B. et al. Optimal DNA extractions from blood on preservation paper limits conservation genomic but not conservation genetic applications // *J. Nat. Conserv.* 2018. V. 46. P. 89–96.
<https://doi.org/10.1016/j.jnc.2018.09.004>
- Maksudov G.Y., Shishova N.V., Katkov I.I. In the cycle of life: cryopreservation of post-mortem sperm as a valuable source in restoration of rare and endangered species // *Endangered species: new research*. 1st ed. Ch. 8 / Ed. A.M. Columbus, L.V. Kuznetsov. NOVA Publishers, 2009. P. 189–240.
- McClendon-Weary B., Putnick D.L., Robinson S., Yeung E. Little to give, much to gain—what can you do with a dried blood spot? // *Curr. Environ. Health Rep.* 2020. V. 7 (3). P. 211–221.
<https://doi.org/10.1007/s40572-020-00289-y>
- McManus C.M., Hermuche P., Guimarães R.F. et al. Integration of georeferenced and genetic data for the management of biodiversity in sheep genetic resources in Brazil // *Trop. Anim. Health Prod.* 2021. V. 53. P. 126.
<https://doi.org/10.1007/s11250-021-02573-x>
- Miller G., Carmichael A., Favret C., Scheffer S. Room temperature DNA storage with slide-mounted aphid specimens // *Insect. Conserv. Div.* 2013. V. 6. P. 447–451.
<https://doi.org/10.1111/j.1752-4598.2012.00207.x>
- Molteni C.G., Terranova L., Zampiero A. et al. Comparison of manual methods of extracting genomic DNA from dried blood spots collected on different cards: implications for clinical practice // *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 2013. V. 3. P. 779–783.
<https://doi.org/10.1177/039463201302600324>
- Muller R., Betsou F., Barnes M.G. et al. Preservation of biospecimens at ambient temperature: special focus on nucleic acids and opportunities for the biobanking community // *Biopreserv. Biobank.* 2016. V. 14 (2). P. 89–98.
<https://doi.org/10.1089/bio.2015.0022>
- Owens C.B., Szalanski A.L. Filter paper for preservation, storage, and distribution of insect and pathogen DNA samples // *J. Med. Entomol.* 2005. V. 42. P. 709–711.
<https://doi.org/10.1093/jmedent/42.4.709>
- Petrova E. Ethical aspects of biobanking in Russia // *Med. Health Care Phil.* 2020. V. 23. P. 207–212.
<https://doi.org/10.1007/s11019-019-09908-3>
- Powell S., Molinolo A., Masmila E., Kaushal S. Real-time temperature mapping in ultra-low freezers as a standard quality assessment // *Biopreserv. Biobank.* 2019. V. 17. P. 139–142.
<https://doi.org/10.1089/bio.2018.0108>
- Rijal R., Sharma R. Ethical considerations in using genetic data from indigenous animal breeds // *J. Agric. Environ. Ethics.* 2022. V. 35. P. 1005–1023.
<https://doi.org/10.1007/s10806-021-09806-4>
- Sakai T., Ishii A., Segawa T. et al. Establishing conditions for the storage and elution of rabies virus RNA using FTA(®) cards // *J. Vet. Med. Sci.* 2015. V. 77. P. 461–465.
<https://doi.org/10.1292/jvms.14-0227>
- Samsonova J.V., Saushkin N.Y., Osipov A.P. Dried Blood Spots technology for veterinary applications and biological investigations: technical aspects, retrospective analysis, ongoing status and future perspectives // *Vet. Res. Comm.* 2022 V. 46 (3). P. 655–698.
<https://doi.org/10.1007/s11259-022-09957-w>
- Schiebelhut L.M., Abboud S.S., Gómez Daglio L.E. A comparison of DNA extraction methods for high-throughput DNA analyses // *Mol. Ecol. Resour.* 2017. V. 17. P. 721–729.
<https://doi.org/10.1111/1755-0998.12620>
- Silva E.C., Pelinca M.A., Acosta A.C. et al. Comparative study of DNA extraction methodologies from goat sperm and its effects on polymerase chain reaction analysis // *Genet. Mol. Res.* 2014. V. 13 (3). P. 6070–6078.
<https://doi.org/10.4238/2014.August.7.21>
- Sintasath D.M., Wolfe N.D., LeBreton M. et al. Simian T-lymphotropic virus diversity among nonhuman primates, Cameroon // *Emerg. Infect. Dis.* 2009. V. 15. P. 175–184.
<https://doi.org/10.3201/eid1502.080584>
- Sjöholm M.I., Dillner J., Carlson J. Assessing quality and functionality of DNA from fresh and archival dried blood spots and recommendations for quality control guidelines // *Clin. Chem.* 2007. V. 53 (8). P. 1401–1407.
<https://doi.org/10.1373/clinchem.2007.087510>
- Smith J.D., Johnson M. Ethical considerations in biobanking // *J. Bioeth. Inquiry.* 2021. V. 18. P. 181–190.
<https://doi.org/10.1007/s11673-021-10045-6>
- Smith L., Burgoyne L. Collecting, archiving and processing DNA from wildlife samples using FTA® databasing paper // *BMC Ecol.* 2004. V. 4. Art. 4.
<https://doi.org/10.1186/1472-6785-4-4>
- Spasskaya N.N., Voronkova V.N., Letarov A.V. et al. Features of reproduction in an isolated island population of the feral horses of the Lake Manych-Gudilo (Rostov region, Russia) // *Appl. Anim. Behav. Sci.* 2022. V. 254. Art. 105712.
<https://doi.org/10.1016/j.applanim.2022.105712>
- Steinberg K., Beck J., Nickerson D. et al. DNA banking for epidemiologic studies: a review of current practices // *Epidemiology.* 2002. V. 13 (3). P. 246–254.
- Tani H., Tada Y., Sasai K., Baba E. Improvement of DNA extraction method for dried blood spots and comparison of four PCR methods for detection of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) infection in canine blood samples // *J. Vet. Med. Sci.* 2008. V. 70. P. 461–467.
<https://doi.org/10.1292/jvms.70.461>
- Venkatesh P., Gopal D. Rapid DNA extraction from dried milk spots: application in non-invasive detection of the A1/A2 variants of beta casein in cow // *PNAS India Sect. B Biol. Sci.* 2018. V. 88. P. 525–529.
<https://doi.org/10.1007/s40011-016-0781-4>
- Wu H., de Gannes M.K., Luchetti G., Pilsner J.R. Rapid method for the isolation of mammalian sperm DNA // *Bio-techniques.* 2015. V. 58 (6). P. 293–300.
<https://doi.org/10.2144/000114280>
- Yu C., Zimmerman C., Stone R. et al. Using improved technology for filter paper-based blood collection to survey wild Sika deer for antibodies to hepatitis E virus // *J. Virol. Meth.* 2007. V. 142. P. 143–150.
<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2007.01.016>

Biomaterial and DNA Bank Organization for Animal Population Genetics Research

V. N. Voronkova^{a,*}, A. K. Piskunov^a, E. A. Soloshenkova^a, Y. V. Samsonova^{a,b}, Yu. A. Stolpovsky^a

^a Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

^b Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

*e-mail: valery.voronkova@gmail.com

Biobanks play an important role in population genetic studies of animals as a valuable resource for *ex situ* conservation of genetic diversity and research in evolution, zoology, ecology and genetics. One of the main objectives of biobanks is to preserve samples of genetic material from different animal species, thus preserving information on genetic diversity and conserving *in situ* populations. This is particularly important for rare and endangered species, animal breeds and plant varieties, where genetic diversity may be declining due to population loss. Biobanks enable the exchange of specimens and data, which plays an important role in the study of the evolution and origins of different species, helping scientists to investigate the processes of divergence and adaptation. They also serve as a source for work in the study of genetic diseases, behavioral traits, and species interactions in ecosystems. Biobanks provide the basis for various types of genetic research, such as genome sequencing, phylogeny, DNA variability analysis, and functional genomics, which in turn provide the opportunity to develop new methods for genetic disease detection, genomic selection, and conservation and restoration of animal populations. Biobanking thus plays an important role in animal population genetics research, providing scientists with access to a wide range of genetic information that is essential for understanding and conserving our planet's biodiversity. The issue of environmentally sound and efficient storage of biomaterial is more relevant than ever. In this review, we consider different approaches to the organization of biomaterials and DNA bank in the field of population genetic studies of animals, peculiarities of their collection, transport, processing and storage.

Keywords: biobank, biomaterial and DNA storage, DNA extraction, transportation of biomaterials, dry blood spot technology