

УДК 562/569:599:577.29

О. Э. Соловей¹, Е. Э. Хейдорова², К. В. Гомель³, В. О. Молчан⁴, А. В. Шпак⁵,**С. В. Пантелеев⁶, Р. А. Ясюченя⁷, Г. В. Сергеев⁸, О. Ю. Баранов⁹, М. Е. Никифоров¹⁰**^{1, 4, 5, 7, 9, 10}Государственное научно-производственное объединение «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по биоресурсам», ул. Академическая, 27, 220072 Минск, Республика Беларусь, ¹oksanka-verbitskaya@mail.ru, ⁴molchan_vladislav@mail.ru,⁵shpak.dvergr@gmail.com, ⁷gregman320@gmail.com, ⁹betula-belarus@mail.ru, ¹⁰nikif@tut.by^{2, 3}Минск, Республика Беларусь, ²hejkat@mail.ru, ³homelkv@gmail.com⁶Государственное научное учреждение «Институт леса Национальной академии наук Беларуси», ул. Пролетарская, 71, 246001 Гомель, Республика Беларусь, stasikdesu@mail.ru⁸Государственное научно-производственное объединение «Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси», ул. Академика Купревича, 2, 220084 Минск, Республика Беларусь, gvserg@iboch.by

ОПЫТ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК ИЗ ИСКОПАЕМЫХ ОСТАНКОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ (МАММАЛИА)

Целью настоящей статьи являлось описание первого в стране опыта оптимизации известных методик пробоподготовки и выделения ДНК из ископаемых останков млекопитающих. В работе использован костный материал бобра евразийского (*Castor fiber* L., 1758), волка обыкновенного (*Canis lupus* L., 1758) и собаки (*Canis familiaris* L., 1758), собранный в местах проведения историко-археологических раскопок. Биологические образцы датируются периодом позднего плейстоцена и раннего неолита (12—8 тыс. лет назад). Данные виды выбраны в качестве модельных, так как их останки широко распространены в археологических памятниках, изучение их ДНК позволяет реконструировать ключевые аспекты древних экосистем, влияние климатических изменений и антропогенных факторов на биоразнообразие. Кроме того, были использованы образцы нижней челюсти евразийского бобра с коренными зубами, датируемые XII—XIII веками, найденные в ходе раскопок городища Свислочь (д. Свислочь, Осиповичский р-н, Могилёвская обл.) на Средней Березине в 2005—2007 годах. Проведенные нами исследования позволили предложить оригинальную методику выделения ДНК из ископаемых останков млекопитающих разного временного периода. Полученные предложенным способом препараты ДНК пригодны для использования в реакциях амплификации со специфическими праймерами, а также для создания геномных и ампликонных библиотек. Результаты проведенных исследований являются основой для последующих филогенетических построений и популяционно-генетического анализа древних ископаемых и археологических образцов животного происхождения в целях оценки древнего биологического разнообразия и культурно-исторической значимости объектов животного мира. В перспективе разработанная методика может быть адаптирована для анализа широкого спектра ископаемых образцов, способствуя развитию отечественной геномики древних остатков и углублению знаний о биоразнообразии прошлых эпох. Это создает новые перспективы для интеграции археологических данных с молекулярными исследованиями и способствует углубленному изучению истории животного мира на территории страны.

Ключевые слова: ископаемые останки млекопитающих; пробоподготовка; древняя ДНК; бобр евразийский; волк обыкновенный; собака; Беларусь.

Рис. 4. Табл. 6. Библиогр.: 37 назв.

О. Е. Solovei¹, E. E. Kheidorova², K. V. Homel³, V. O. Molchan⁴, A. V. Shpak⁵, S. V. Panteleev⁶,**R. A. Yasyuchenya⁷, G. V. Sergeev⁸, O. Yu. Baranov⁹, M. E. Nikiforov¹⁰**^{1, 4, 5, 7, 9, 10}The State Research and Production Association “Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences of Belarus for Bioresources”, 27 Akademicheskaya str., 220072 Minsk, the Republic of Belarus,¹oksanka-verbitskaya@mail.ru, ⁴molchan_vladislav@mail.ru, ⁵shpak.dvergr@gmail.com,⁷gregman320@gmail.com, ⁹betula-belarus@mail.ru, ¹⁰nikif@tut.by^{2, 3}Minsk, the Republic of Belarus, ²hejkat@mail.ru, ³gomelkv@gmail.com⁶The State Scientific Institution “Institute of Forests of the National Academy of Sciences of Belarus”, 71 Proletarskaya str., 246001 Gomel, the Republic of Belarus, stasikdesu@mail.ru⁸The State Scientific Institution “Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus”, 2 Academician Kuprevich str., 220084 Minsk, the Republic of Belarus, gvserg@iboch.by

EXPERIENCE OF DNA EXTRACTION FROM FOSSIL REMAINS OF MAMMALS (MAMMALIA)

The objective of this article was to describe the first experience of optimizing the known method for sample preparation and DNA extraction from mammal remains in the country. The study involved bone remains of the Eurasian beaver (*Castor fiber* L., 1758), the gray wolf (*Canis lupus* L., 1758) and the dog (*Canis familiaris* L., 1758) from historical and archaeological excavation sites. The biological remains date back to the Late Pleistocene and Early Neolithic (12.000—8.000 years ago). These species were chosen as models because their remains are widely found in archaeological sites, and studying their DNA allows us to reconstruct key aspects of ancient ecosystems, the impact of climate change and anthropogenic factors. There were also used remains of the lower jaw of the Eurasian beaver with molars dating back to the 12th—13th centuries and found during archaeological excavations in the hillfort Svisloch (Svisloch village, Osipovichsky district, Mogilev region) on the Middle Berezina in 2005—2007. The studies we have conducted allow us to propose an original method for isolating DNA from natural remains of mammals of different time periods. The DNA preparations obtained by the proposed method are suitable for use in amplification reactions with specific primers, as well as for creating genomic and amplicon libraries. The results of the conducted research are intended for use in phylogenetic constructions and population genetic analysis of ancient fossils and archaeological samples of animal origin for the purpose of assessing ancient biological diversity and preserving the cultural and historical value of wildlife. In future perspectives, the developed method can be adapted for analyzing a wide range of fossil samples, contributing to the development of domestic genomics of ancient remains and deepening our understanding of biodiversity in the past epochs. This creates new opportunities for integrating archaeological data with molecular research and promotes an in-depth study of the history of animal life in the country.

Key words: mineral remains of mammals; sample preparation; ancient DNA; the Eurasian beaver; the common wolf; the dog; Belarus.

Fig. 4. Table 6. Ref.: 37 titles.

Введение. Древняя ДНК — это ДНК, выделенная из ископаемых биологических образцов, возраст которых, как правило, датируется от нескольких сотен до миллиона лет. Исследования, проводимые с расшифровкой древней ДНК, имеют не только фундаментальную, но и практическую значимость в рамках многих научных направлений, связанных с вопросами археологии, экологии, молекулярной эволюции и популяционной генетики. Так, например, древняя ДНК используется в исследованиях, посвященных эволюции человека [1—4], уточнению систематики [5—8] и происхождения различных таксонов [9], анализу процессов миграции и расселения в филогенезе [10; 11], возникновению факторов патогенности микроорганизмов [12—15], установлению структуры древних сообществ организмов [16; 17], формированию адаптационной изменчивости у животных [18; 19] и растений [20], поиску ценных фенотипических признаков [21] в целях их будущего использования в селекционном процессе [22].

Исследования на основе древней ДНК включают в филогенетические деревья ныне исчезнувшие виды животных [23—25], что позволяет выяснить или уточнить происхождение современных видов, исторические и эволюционные процессы в популяциях. Именно благодаря изучению древней ДНК было показано, что многие виды животных скрещивались в прошлом, оставляя генетический след в современных видах. Так, исследователи выяснили, что современные бурые медведи (*Ursus arctos* L., 1758) несут в себе фрагменты геномов вымерших пещерных медведей (*Ursus spelaeus* Rosenmüller, 1794) [26]. Древние образцы позволяют точнее определить время расхождения видов и скорость мутаций, т. е. помогают откалибровать молекулярные часы эволюции. Например, анализ ДНК древних собак показал, что их одомашнивание началось раньше, чем считалось [27].

Несмотря на то, что исследования древней ДНК активно проводятся уже на протяжении почти сорока лет, до сих пор критически значимыми этапами, обуславливающими качество и результативность всех последующих стадий анализа, являются получение качественных препаратов нуклеиновых кислот и устранение постмортальных нуклеотидных модификаций. В связи с увеличением объема анализируемых геномных данных актуальной задачей представляется и совершенствование биоинформатических подходов, направленных на элиминацию

сторонних последовательностей, распознавание и коррекцию ошибок секвенирования, ассемблирование коротких прочтений в контиги, аннотацию целевых участков генома.

Основная проблема при работе с древней ДНК заключается в её высокой деградации и возможности загрязнения современным чужеродным наследственным материалом, что является серьёзным препятствием для наработки целевого фрагмента генома. Сохранность ДНК в ископаемых биологических образцах в значительной степени зависит от внешних факторов среды, главными из которых, как правило, являются температура и влажность [28]. Однако результаты многочисленных исследований показали, что даже в наиболее оптимальных условиях вечной мерзлоты ДНК не может сохраняться на протяжении более 1 млн лет. Ископаемый древний материал — ресурс относительно редкий, уязвимый и зачастую ограниченный, в связи с чем не всегда удаётся использовать оптимальную с точки зрения сохранности часть образца, как, например, корни волос [29], кости и зубы позвоночных [30; 31], перья [32], яичную скорлупу [33], раковину моллюсков [34]. Большинство современных исследований при работе с древними останками животных в качестве источника древней ДНК используют главным образом кости и зубы.

На данный момент существует ряд подходов по выделению древней ДНК: путем адсорбции молекул нуклеиновых кислот на кремниевые или полимерно-магнитные частицы в хаотропно связывающем буфере, аффинной хроматографии, иммобилизации на искусственных мембранах [35; 36]. В то же время эффективность использования того или иного способа в значительной степени зависит от типа образца, его состояния и условий хранения, что зачастую требует оптимизации методик или использования комбинированных подходов [37]. Качество препаратов древней ДНК характеризуется такими показателями, как средний размер выделяемых фрагментов (как правило, < 125 п. н.), соотношение «древней» и сторонней (как правило, бактериальной или грибной) ДНК, наличие ингибиторов ферментов, используемых в молекулярно-генетических исследованиях [35]. В целом протокол для выделения ДНК из древних ископаемых останков животных должен увеличивать выход эндогенной ДНК, обеспечивать максимальное уменьшение доли в экстракте экзогенной чужеродной ДНК и сводить к минимуму присутствие потенциальных ингибиторов процесс полимеразной цепной реакции (далее — ПЦР).

Актуальность проведенных нами исследований заключается в необходимости совершенствования методических подходов по выделению древней ДНК из образцов животного происхождения с использованием новых комплексных составов детергентов и восстановления полученных препаратов древней ДНК от повреждений с применением комбинированных ферментных смесей. Целью настоящей статьи являлось описание первого в стране опыта оптимизации известных методик пробоподготовки и выделения ДНК из ископаемых остатков млекопитающих.

Материалы и методы исследования. Для получения препаратов нуклеиновых кислот из ископаемых образцов животного происхождения в работе были использованы костные останки бобра евразийского (*Castor fiber* L., 1758) (6 образцов), волка обыкновенного (*Canis lupus* L., 1758) (4 образца) и собаки (*Canis familiaris* L., 1758) (1 образец), которые датированы периодом плейстоцена и раннего неолита (12—8 тыс. лет назад). Останки перечисленных видов животных часто встречаются в местах проведения историко-археологических раскопок. Внешний вид исследованных ископаемых образцов биоматериала млекопитающих показан на рисунке 1, а в таблице 1 представлена вся имеющаяся по ним сопроводительная информация.



Рисунок 1. — Образцы ископаемого биоматериала животного происхождения

Figure 1. — Fossil biological material samples of animal origin

Т а б л и ц а 1. — Описание проб, задействованных в исследовании, из ископаемых костных останков млекопитающих периода позднего плейстоцена и раннего неолита (12—8 тыс. лет назад)

T a b l e 1. — Description of samples involved in the study, derived from fossil mammalian bones from the Late Pleistocene and early Neolithic periods (12.000—8.000 years ago)

Вид животного	Номер п / п	Номер образца	Дополнительные метки	Сфера деятельности
<i>Castor fiber</i> L., 1758	1	1246	Вк-3-7, 152, зуб	Археология
	2	592	Вк-66-4, 152, плечевая кость бобра	Археология
	3	2061	Вк-18-9, 152, плечевая кость бобра	Археология
	4	1035	Вк-66-6, 152, плечевая кость бобра	Археология
	5	2	Сморгонь	
	6	683	683-ВК-18-5, 152	
<i>Canis lupus</i> L., 1758	1	2600/30363	Кость (метаподия), 95, ПК-49	Палеонтология
	2	2600/3853	Кость (метаподия), 95, ПК-49	Палеонтология
	3	2600/4665	Кость (заплюсна), 95, ПК-49	Палеонтология
	4	2600/22009	Кость (заплюсна), 95, ПК-49	Палеонтология
<i>Canis familiaris</i> L., 1758	1	13/234	13-12в	

Также в работе были использованы датируемые XII—XIII веками 7 образцов нижней челюсти евразийского бобра с коренными зубами, собранные сотрудниками Института истории НАН Беларуси в период археологических раскопок городища Свислочь на Средней Березине в 2005—2007 годах (д. Свислочь, Осиповичский р-н, Могилёвская обл.). Это городище являлось важным пунктом на пересечении торговых путей по рекам Березина и Свислочь. Перечень проб и информация об археологических костных останках бобра XII—XIII веков представлены в таблице 2.

Т а б л и ц а 2. — Описание проб из археологических ископаемых костных останков *Castor fiber*, задействованных в отработке методики выделения ДНК

T a b l e 2. — Description of samples from archaeological fossil bones of *Castor fiber* involved in the development of the DNA extraction method

Номер образца	Код образца	Место, год раскопок	Пласт / отметка по высоте	Квадрат
1	06.5.16	Свислочь, 2006	V / R220-240	16
2	05.4.8	Свислочь, 2005	IV / R220-240	8
3	07.5.4	Свислочь, 2007	V / R220-240	4
4	07.5.20	Свислочь, 2007	V / R220-240	20
5	05.4.5	Свислочь, 2005	IV / R220-240	5
6	05.3.5	Свислочь, 2005	III / R200-220	5
7	07.3.18	Свислочь, 2007	III / R200-220	18

Результаты исследования и их обсуждение. Проведенные лабораторные работы позволили определить эффективные алгоритмы для пробоподготовки и выделения ДНК из ископаемых остатков млекопитающих, обеспечивающие увеличение выхода древней ДНК и уменьшение доли примесей чужеродного наследственного материала и потенциальных ингибиторов ПЦР. Ниже описаны авторские методики пробоподготовки и получения препаратов нуклеиновых кислот, их восстановления из ископаемых образцов животного происхождения, разработанные на основе оптимизации ранее известных подходов.

На стадии пробоподготовки перед получением костного порошка все ископаемые образцы предварительно промывались дистиллированной водой и очищались от грязи стерильной щеткой, далее на 2 мин. замачивались в 5 %-ном растворе натрия хлорида с последующей обработкой УФ-излучением в течение 30 мин. Затем наждачной бумагой снимался наружный слой кости (около 1,0—1,5 мм). Мелкодисперсный порошок костного материала получали путем высверливания отверстий в костях и зубах алмазными сверлами диаметром 2 мм на минимальных оборотах с перерывами для предупреждения чрезмерного нагрева и повреждения ДНК под действием высоких температур.

Процедура экстракции ДНК осуществлялась в антисептических условиях с использованием специально подготовленного инструмента и практик, минимизирующих риск контаминации чужеродным генетическим материалом (ДНК современных образцов млекопитающих, бактериальных и грибных культур). Выделение ДНК проводили с негативным контролем тремя способами:

1) с использованием коммерческого набора GENE CLEAN Kit for Ancient DNA согласно протоколу производителя по варианту бб (применялся для всех образцов как периода плейстоцена, так и средних веков);

2) модифицированным методом в присутствии ацетата аммония (применялся при выделении ДНК из костных останков евразийского бобра XII—XIII веков);

3) модифицированным СТАВ-методом.

При выделении древней ДНК набором GENE CLEAN Kit for Ancient DNA необходимо перенести 430 мг костного порошка в 2 мл пробирки типа Эппендорф; добавить 1 мл Dehybernation Solution B (раствор на основе EDTA) и растереть смесь стеклянным пестиком; инкубировать образцы при температуре 45 °С всю ночь с непрерывным перемешиванием смеси лабораторным шейкером; перемешать смесь на вортексе, а затем центрифугировать на высоких оборотах (10 000g) в течение 5 мин.; перенести 400 мкл супернатанта в новые 2 мл пробирки типа Эппендорф; добавить 300 мкл Ancient DNA GLASSMILK и инкубировать при комнатной температуре в течение 30 мин. с непрерывным перемешиванием; перенести смесь супернатанта с GLASSMILK в SPIN Filter Tube и центрифугировать при 14 000g в течение 1 мин. или до полного прохождения смеси через фильтр в собирательную часть пробирки;

добавить в каждую пробирку 0,5 мл Salton Wash #1 для промывки GLASSMILK-DNA комплекса; добавить в каждую пробирку 0,5 мл Salton Wash #2 для повторной промывки комплекса GLASSMILK-DNA; добавить в каждую пробирку 0,5 ml Ancient DNA Alcohol Wash и центрифугировать при 14 000g в течение 1 мин. для очистки фильтра от Wash Solution; освободить собирательную пробирку Catch Tube от жидкости Wash Solution и центрифугировать при 14 000g в течение 1 мин. для высушивания GLASSMILK на фильтре колонки SPIN Filter Tube; перенести колонки с фильтром в новые DNA-free Elution Catch Tube и элюировать ДНК добавлением 50 мкл DNA-free Elution Solution; центрифугировать 1 мин. при 14 000g для сбора элюата в пробирки.

При выделении древней ДНК в присутствии ацетата аммония образцы в виде костной стружки весом ~ 150 мг необходимо поместить в предварительно облученные под ультрафиолетом стерильные пробирки типа Эппендорф (2 мл); залить 750 мкл 0,5М раствора ЭДТА и инкубировать в течение 1 ч. при температуре 56 °С; дважды повторить следующие этапы: центрифугировать образцы при 10 000g 1 мин. и удалить супернатант, добавить 1 мл дистиллированной воды и встряхнуть на вортексе; далее лизировать полученный осадок в 450 мкл лизирующего раствора (1М Tris-HCl, 0,5М ЭДТА, 2 % додецилсульфата натрия по массе, 1М NaCl, 0,06 мг / мл протеиназы К), 35 мкл SDS (25 %) и 8 мкл Протеиназы К; инкубировать всю ночь при температуре 56 °С с постоянным перемешиванием; встряхнуть образцы на вортексе, добавить 150 мкл 10М ацетата аммония, аккуратно перемешать и поместить на -20 °С на 20 мин.; добавить 300 мкл хлороформа, интенсивно вортексировать и центрифугировать на 20 000g в течение 20 мин.; перенести супернатант в новую 2 мл пробирку с добавлением 1 мл 96 %-ного этанола, аккуратно перемешать и поместить на -20 °С на 15 мин.; центрифугировать на 20 000g в течение 10 мин. и удалить супернатант; добавить 500 мкл 70 %-ного этанола и инкубировать при комнатной температуре 5 мин.; центрифугировать на 20 000g в течение 5 мин., удалить супернатант и высушить осадок; растворить осадок в 30 мкл ТЕ-буфера (Tris 10мМ + EDTA 1мМ). Ацетат аммония обеспечивает эффективное осаждение ДНК из растворов, особенно при низких концентрациях ДНК и в сложных матрицах.

При выделении древней ДНК СТАВ-методом необходимо образцы в виде костной стружки весом ~ 250 мг поместить в центрифужные пробирки типа Эппендорф объемом 1,5—2,0 мл, содержащие 800 мкл буфера для экстракции (700 мкл СТАВ: 2 %-ный раствор бромида цетилтриметиламмония (СТАВ); 0,1М раствор Трис; 1,4М раствор хлорида натрия; 20 мМ раствор трилона Б; 85 мкл PVP (поливинилпирролидон): 120 мг / 1 000 мкл воды; 15 мкл DTT (дитиотреитол): 31 мг / 100 мкл воды; при необходимости значение pH экстрагирующего буфера доводится HCl до значения 8,0); провести ручную гомогенизацию костного материала с использованием стеклянных пестиков при комнатной температуре в течение 2—3 мин.; добавить дополнительно 200 мкл СТАВ-буфера и оставить при комнатной температуре на 10 мин.; центрифугировать на скорости 5 000 об / мин при температуре 18—20 °С в течение 5 мин. для осаждения крупных костных остатков; пипеточным дозатором с пластиковым наконечником с фильтром отобрать 400 мкл (или больше, если позволяет объем) надосадочной жидкости и перенести в другую центрифужную пробирку типа Эппендорф объемом 1,5 мл; в пробирки с супернатантом добавить хлороформ в соотношении 1 : 1 и перемешать содержимое в течение 10 мин. при комнатной температуре на шейкере либо вручную; центрифугировать при 13 000 об / мин в течение 10 мин. при температуре 18—20 °С; пипеточным дозатором с пластиковым наконечником с фильтром отобрать около 200—250 мкл супернатанта в новую центрифужную пробирку типа Эппендорф объемом 1,5 мл; к супернатанту добавить изопропиловый спирт в объемном соотношении 1 : 1; перемешать вручную 4—5-кратным переворачиванием, затем инкубировать 10 мин. при комнатной температуре; центрифугировать при 13 000 об / мин при комнатной температуре в течение 10 мин.; удалить супернатант и промыть содержащий ДНК осадок добавлением в пробирку 1 мл охлажденного до температуры -10 °С 70 %-ного этанола; инкубировать 10 мин. в морозильной

камере при температуре от -4 до -10 °С; центрифугировать на скорости 13 000 об / мин при температуре 4 °С в течение 5 мин.; затем аккуратно удалить содержимое пробирок, не касаясь содержащего ДНК осадка; повторить промывку осадка ДНК; удалить этанол и просушить осадок с ДНК до полного испарения этанола в ламинарном боксе (без нагревания и воздействия УФ) в течение 20—30 мин.; в пробирки с высушенным осадком добавить 20 мкл бидистиллированной воды; инкубировать пробирки с закрытыми крышками в твердотельном термостате при 45 °С в течение 15 мин.

Применение коммерческого набора GENE CLEAN Kit for Ancient DNA и модифицированного СТАВ-метода позволило выделить ДНК из более древних образцов бобра евразийского, волка обыкновенного и собаки. Мы столкнулись с рядом сложностей при использовании коммерческого набора для выделения ДНК из образцов XII—XIII веков, возможно, ввиду того, что данный набор рекомендуется использовать на сложных, сильно деградированных и содержащих примеси образцах. Метод экстракции в присутствии ацетата аммония позволил получить препараты ДНК из образцов костных останков евразийского бобра XII—XIII веков.

Измерение концентрации выделенной ДНК осуществляли с помощью спектрофотометра NanoPhotometer P330, примеры даны в таблицах 3 и 4.

Т а б л и ц а 3. — Показатели концентрации и чистоты препаратов ДНК из древних костных образцов модельных видов животных, полученных с использованием набора GENE CLEAN Kit for Ancient DNA

T a b l e 3. — Indicators of concentration and purity of DNA preparations from ancient bone samples of model animal species obtained by using the GENE CLEAN Kit for Ancient DNA

Номер образца	Вид животного	Концентрация, нг / мкл
1035	Бобр евразийский (<i>Castor fiber</i>)	9,5
2061	Бобр евразийский (<i>Castor fiber</i>)	78,5
592	Бобр евразийский (<i>Castor fiber</i>)	43,5
1246	Бобр евразийский (<i>Castor fiber</i>)	29,0
683	Бобр евразийский (<i>Castor fiber</i>)	0,217
2	Бобр евразийский (<i>Castor fiber</i>)	10,0
2600/30363	Волк обыкновенный (<i>Canis lupus</i>)	122,0
2600/3853	Волк обыкновенный (<i>Canis lupus</i>)	28,5
2600/4665	Волк обыкновенный (<i>Canis lupus</i>)	121,0
2600/22009	Волк обыкновенный (<i>Canis lupus</i>)	61,5
13/234	Собака (<i>Canis familiaris</i>)	65,0

Т а б л и ц а 4. — Показатели концентрации препаратов ДНК из древних костных образцов модельных видов животных, полученных с использованием СТАВ-метода

T a b l e 4. — Indicators of concentration of DNA preparations from ancient bone samples of model animal species obtained by using the STAB method

Номер образца	Вид животного	Концентрация, нг / мкл
2061	Бобр евразийский (<i>Castor fiber</i>)	38,0
1035	Бобр евразийский (<i>Castor fiber</i>)	27,5
592	Бобр евразийский (<i>Castor fiber</i>)	16,0
2600/4665	Волк обыкновенный (<i>Canis lupus</i>)	73,5

Успех выделения ДНК не всегда был 100 %-ным, однако полученные препараты ДНК в большинстве своем показали достаточные уровни концентрации. Величина показателя A260 / A280 также была не ниже 1,5, что указывает на достаточный уровень чистоты выделенной ДНК от возможных примесей белков.

Образцы полученных препаратов ДНК были восстановлены путем репарации с использованием набора PreCR Repair Mix (New England Biolabs, США) по модифицированному протоколу: при комнатной температуре смешивали 5 мкл 1X буфера ThermoPol, 0,5 мкл 10 mM dNTP, 0,5 мкл 1X НАД+, 1 000 нг поврежденной ДНК-матрицы (с учетом гиперхромизма) и 1 мкл BSA (20 мг / мл); деионизированной водой доводили до 49 мкл; добавляли 1 мкл PreCR Repair Mix и осторожно перемешивали пипетированием; инкубировали реакцию репарации в течение 30 мин. при 37 °С и затем помещали на лед.

В целях проверки пригодности препаратов ДНК, полученных из плейстоценовых образцов млекопитающих, были разработаны две пары праймеров для амплификации коротких участков начала гена первой субъединицы цитохром-с-оксидазы (таблица 5) и составлена следующая реакционная смесь финальным объемом 25 мкл: 2X премикс Green PCR Master Mix (DreamTaq) — 12,5 мкл, прямой и обратный праймеры — по 1,0 мкл концентрацией 5 пмоль / мкл, ДНК-матрица — 5 мкл; *mQ* вода в объеме для доведения реакционной смеси до 25 мкл.

Амплификацию проводили на термоциклере Bio-Rad C1000 Touch (США) при следующих температурных условиях: предварительная денатурация — при 95 °С 5 мин.; 40 циклов в режиме: денатурация (95 °С, 20 с.), отжиг (55 °С, 20 с.) и элонгация (72 °С, 20 с.); окончательная достройка цепей ДНК — при 72 °С 10 мин.

Для проверки качества ДНК из образцов евразийского бобра XII—XIII веков провели амплификацию фрагментов коротких участков контрольного региона мтДНК (рисунок 2) с использованием следующих пар праймеров: Cf1F-Cf6R (ожидаемая длина продукта — 350 п. н.), Cf10F-Cf10R (ожидаемая длина продукта — 90 п. н.). Для получения короткого участка мтДНК применили метод «гнездовой» ПЦР с использованием праймеров Cf1F-Cf3R и Cf2F-Cf2R.

Для приготовления ПЦР-смеси использовали премикс ArtMix HF ДНК полимеразы (2,5X) (ArtBioTech). Концентрация всех праймеров равнялась 5 пмоль / мкл. Полимеразную цепную реакцию проводили в следующем режиме: первичная денатурация — при 98 °С 30 с., 35 циклов с денатурацией при 98 °С 5 с., отжигом при 55 °С 10 с. и элонгацией при 72 °С 20 с., 5-минутная элонгация при 72 °С.

Электрофоретическое фракционирование продуктов амплификации проводили в 2 %-ном агарозном геле (2 г агарозы Agarose Low EEO (Condalab, Испания) в 98 мл буфера на основе бората натрия рН 8,0) в присутствии бромистого этидия в горизонтальной камере Biorad MiniGel при комнатной температуре и электрическом токе 100 V / 40 мА в течение 37 мин. Результаты визуализации некоторых продуктов ПЦР представлены на рисунке 3.

Т а б л и ц а 5. — Последовательности праймеров для амплификации участков начала гена первой субъединицы цитохром-с-оксидазы мтДНК

T a b l e 5. — Primer sequences for amplification of the regions of the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I gene

Название праймера	Последовательность (5'-3')	Размеры продуктов ПЦР, пары оснований
ST-nest F	CTTACTATTTGGAGCATGAGC	111
ST-nest R	ACATTATAAATTTGATCGTCACCT	
In-nest F	GCCCATGCTTTCGTAATAATC	120
In-nest R	GTTATTTATTCGGGGGAATGC	

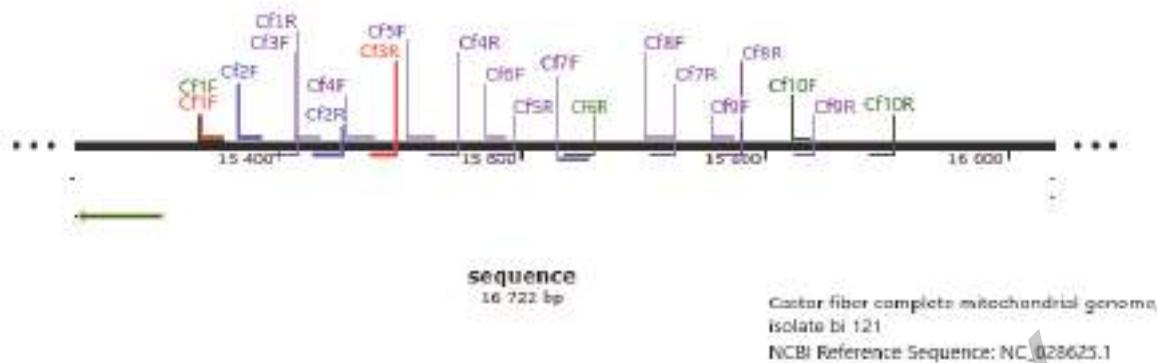


Рисунок 2. — Праймеры для амплификации фрагментов контрольного региона (*D-loop*) мтДНК евразийского бобра (*Castor fiber*)

Примечание — Красным и синим цветами выделены праймеры, используемые при постановке «гнездовой» ПЦР, зеленым цветом — стандартной ПЦР.

Figure 2. — Primers for amplification of the mitochondrial DNA control region (*D-loop*) of the Eurasian beaver (*Castor fiber*)

Note — Primers used in nested PCR are highlighted in red and blue, while those used in standard PCR are highlighted in green.



Рисунок 3. — Результаты электрофоретического разделения ПЦР продуктов, полученных из образцов древней ДНК волка и собаки с праймерами ST-nest (COI): 1—4 — *Canis lupus* (№ 2600/30363); 5—8 — *Canis familiaris* (№ 13/234)

Figure 3. — Electrophoretic separation results of PCR products obtained from the ancient wolf and the dog DNA samples using primers ST-nest (COI): 1—4 — *Canis lupus* (№ 2600/30363); 5—8 — *Canis familiaris* (№ 13/234)

Для верификации результатов ПЦР избранные продукты амплификации (таблица 6) были подвергнуты секвенированию по Сэнгеру в генетическом анализаторе 3500 Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с протоколом фирмы-изготовителя с использованием программного пакета Sequencing Analysis Software 5.1.1. (Thermo Fisher Scientific, США).

Достоверность амплификации целевых молекулярных маркеров мтДНК была подтверждена путем сравнительного анализа с нуклеотидными последовательностями из международной базы GenBank NCBI: фрагментов гена первой субъединицы цитохромоксидазы С — для образцов волка (2600/30363), бобра (592) и собаки (13/234) периода

плейстоцен-голоцена (раннего неолита); участков контрольного региона — для образца бобра XII—XIII веков (07.5.4). Пример верификации плученных фрагментов мтДНК представлен на рисунке 4.

Таким образом, можно констатировать, что в результате амплификации, проведенной на основе выделенных образцов древней ДНК, были получены фрагменты митохондриального генома размером 74—324 п. н., подтверждающие видовую принадлежность исследованных образцов животных.

Т а б л и ц а 6. — Расшифрованные последовательности мтДНК исследованных образцов

T a b l e 6. — Decoded mitochondrial DNA sequences of the examined samples

Номер п / п	Код образца	Маркер / размер ПЦР-продукта, п. о.	Последовательность (5'-3')
<i>Собака (Canis familiaris)</i>			
1	13/234	<i>Cox 1 / 58</i>	TCCGAGCCGAAGTACGGTCAGCCCGGTACTTTACTAGGTGACGATCAAATTTATAATG
<i>Волк обыкновенный (Canis lupus)</i>			
2	2600/30363	<i>Cox 1 / 87</i>	GTTAGTAGGCACTGCCTTGAGCCTCCTCATCCGAGCCGAACTAGGTGACCCCGGTACTTTACTAGGTGACGATCAAATTTAATGT
<i>Евразийский бобр (Castor fiber)</i>			
3	592	<i>Cox 1 / 80</i>	TCCTTATTGGGGGCTTTGGTAAITGAYTAGTGCCTTTAATAATCGGAGCCCTGACATAGCATTCCCCCGAATAAATAAC
4	06.5.16	<i>D-loop / 86</i>	GGAATGTCCTCTTCTCGCTCCGGGCCCATACGTTCTAAGGGTTTCTATACTGAAACTATACCTGGCATCTGGTTCTTACTTCAGG
5	06.5.16	<i>D-loop / 74</i>	AAGCTTTGGGTGCTGATGGTGGGACTTTGTTTCTCCCCTGATGCCCTGAGGGGAGTGTTCCTCCCATGCTGGTA
6	05.4.8	<i>D-loop / 75</i>	AAGCTTTGGGTGCTGATGGTGGGACTTTGTTTCTCCCCTGATGCCCTGAGGGGAGTGTTCCTCCCATATCTTATT
7	07.5.4	<i>D-loop / 323</i>	ACCAGCAATGGGGAAACTCCCCTCAGGGCATCAGGGGAGAAACAAGTCCCACCATCAGCACCCAAAGCTGACATTCTCATAATTAACATATCCCCTGTAACATATACATGTACATAATCAACAGTCTATGTATATCGTGCATTATGTTATATCCACATCAATAATGCTTGAGTACTTTAAATGTTAATCGTACATAGTACATAACTGTATAATCGTACATATTAAGTTCTTCGAGCAGGAATAACAAGCACGTATAAATGACAAGGTAGACTATAATACATAGTAGTATTGATCAACATAACACCAATTCAGCATG
8	07.5.20	<i>D-loop / 86</i>	GGAATGTCCTCTTCTCGCTCCGGGCCCATACGTTCTGGGGGTTTCTATACTGAAACTATACCTGGCATCTGGTTCTTACTTCAGG
9	05.4.5	<i>D-loop / 86</i>	GGGATGTCCTCTTCTCGCTCCAGACCCATACGTTCTGGGGGTTTCTATAATTGAAACTATACCTGGCATCTGGTTCTTACTTCAGG
10	05.3.5	<i>D-loop / 86</i>	GGAATGTCCTCTTCTCGCTCCGGGCCCATACGTTCTGGGGGTTTCTATACTGAAACTATACCTGGCATCTGGTTCTTACTTCAGG
11	07.3.18	<i>D-loop / 86</i>	GGAATGTCCTCTTCTCGCTCCGGGCCCATACGTTCTGGGGGTTTCTATGTTGAAACTATACCTGGCATCTGGTTCTTACTTCAGG

Castor fiber complete mitochondrial genome, isolate tu 161Sequence ID: [FR691688.1](#) Length: 16691 Number of Matches: 1Range 1: 15335 to 15657 [GenBank](#) [Graphics](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
580 bits(314)	3e-161	320/323(99%)	0/323(0%)	Plus/Plus
Query 1	ACCAGCAATGGGGAACACTCCCTCAGGGCATCAGGGGAGAAACAAAGTCCCAC			
Sbjct 15335	ACCAGCAATGGGGAACACTCCCTCAGGGCATCAGGGGAGAAACAAAGTCCCAC			
Query 61	GCACCCAAAGCTGACATTCTCATAATTAACATATCCCCTGTAACATATACATGTA			
Sbjct 15395	GCACCCAAAGCTGACATTCTCATAATTAACATATCCCCTGTAACATATACATGTA			
Query 121	TACAACAGTCTATGTATATCGTGCATTATGTTATATCCACATCAATAATGCTTG			
Sbjct 15455	TACAACAGTCTATGTATATCGTGCATTATGTTATATCCACATCAATAATGCTTG			
Query 181	TTTAAATGTTAATCGTACATAGTACATAAC TGTATAATCGTACATATTAAGTTCT			
Sbjct 15515	TTTAAATGTTAATCGTACATAGTACATAAC TGTATAATCGTACATATTAAGTTCT			
Query 241	CAGGAATAACAAGCACGTATAATAATGACAAGGTAGACTATAATACATAGTAGTA			
Sbjct 15575	CAGGAATAACAAGCACGTATAATAATGACAAGGTAGACTATAATACATAGTAGTA			
Query 301	CAACATAACACCAATTCAGCATG 323			
Sbjct 15635	CAACATAATACCAGCTCAGCATG 15657			

Рисунок 4. — Верификация полученных фрагментов мтДНК бобра евразийского № 07.5.4 (*D-loop*, 323 п. н.) относительно данных нуклеотидных последовательностей из GenBank NCBI

Figure 4. — Verification of the obtained mitochondrial DNA fragments of the Eurasian beaver No 07.5.4 (*D-loop*, 323 b. p.) against nucleotide sequences from GenBank NCBI

Закключение. Проведенные нами исследования позволили предложить оригинальную методику выделения ДНК из ископаемых останков грызунов и хищных млекопитающих разного временного периода: от плейстоцена до средних веков. Полученные препараты древней ДНК в большинстве своем показали достаточные уровни концентрации и чистоты и были пригодны для использования в реакциях амплификации со специфическими праймерами.

Применимость методов выделения напрямую зависит от сохранности исходных образцов: степени их деградации, наличия примесей и условий хранения. Вместо использования готовых коммерческих наборов мы рекомендуем использовать данные оптимизированные протоколы на основе доступных реагентов, что позволяет гибко регулировать условия лизиса, очистки и элюирования целевых компонентов в зависимости от состояния пробы. Это обеспечивает стабильный результат без дополнительных затрат, а также позволяет модифицировать методику под конкретные исследовательские задачи.

Эффективность и достоверность экстракции древней ДНК предложенными методиками подтверждена успехом секвенирования целевых маркеров митохондриального генома размером 74—324 п. н. и результатами их сравнительного анализа с нуклеотидными последовательностями GenBank NCBI, подтверждающими видовую принадлежность исследованных образцов животных.

Проведенные молекулярно-генетические исследования могут стать основой для последующих филогенетических построений и популяционно-генетического анализа ископаемых и археологических образцов животного происхождения. Изучение ДНК ископаемых образцов фауны позволяет реконструировать ключевые аспекты древних экосистем, влияние на них климатических изменений и антропогенных факторов.

Авторы выражают глубокую признательность сотрудникам ГНУ «Институт истории НАН Беларуси» А. Н. Вашанову и кандидату биологических наук В. И. Кошману за предоставление образцов биоматериала животного происхождения.

Работа выполнена в рамках проекта фундаментальных и прикладных научных исследований Национальной академии наук Беларуси «Разработка методов получения и анализа древней ДНК диких животных и растений» (рег. № НИОКТР20231461) в 2023—2025 годах.

Список цитируемых источников

1. Genetic history of an archaic hominin group from Denisova Cave in Siberia / D. Reich, R. E. Green, M. Kircher [et al.] // *Nature*. — 2010. — Vol. 468. — P. 1053—1060.
2. A draft sequence of the Neandertal genome / R. E. Green, J. Krause, A. W. Briggs [et al.] // *Science*. — 2010. — Vol. 328. — P. 710—722.
3. A high-coverage genome sequence from an archaic Denisovan individual / M. Meyer, M. Kircher, M.-T. Gansauge [et al.] // *Science*. — 2012. — Vol. 338. — P. 222—226.
4. The complete genome sequence of a Neanderthal from the Altai Mountains / K. Prüfer, F. Racimo, N. Patterson [et al.] // *Nature*. — 2013. — Vol. 505. — P. 43—49.
5. Relationships of the extinct moa-nalos, flightless Hawaiian waterfowl, based on ancient DNA / M. D. Sorenson, A. Cooper, E. E. Paxinos [et al.] // *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. — 1999. — Vol. 266. — P. 2187—2193.
6. A molecular phylogeny of two extinct sloths / D. Greenwood, J. Castresana, G. Feldmaier-Fuchs, S. Pääbo // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. — 2001. — Vol. 18. — P. 94—103.
7. Flight of the dodo / B. Shapiro, D. Sibthorpe, A. Rambaut [et al.] // *Science*. — 2002. — Vol. 295. — P. 1683.
8. Genomic evidence of widespread admixture from polar bears into brown bears during the last ice age / J. A. Cahill, I. Stirling, L. Kistler [et al.] // *Molecular Biology and Evolution*. — 2018. — Vol. 35. — P. 1120—1129.
9. Recalibrating Equus evolution using the genome sequence of an early Middle Pleistocene horse / L. Orlando, A. Ginolhac, G. Zhang [et al.] // *Nature*. — 2013. — Vol. 499. — P. 74—78.
10. Complete genomes reveal signatures of demographic and genetic declines in the woolly mammoth / E. Palkopoulou, S. Mallick, P. Skoglund [et al.] // *Current Biology*. — 2015. — Vol. 25. — P. 1395—1400.
11. Rapid range shifts and megafaunal extinctions associated with late Pleistocene climate change / F. V. Seersholm, M. W. Pedersen, M. J. Sjøe [et al.] // *Nature Communications*. — 2020. — Vol. 11. — P. 2770.
12. A draft genome of *Yersinia pestis* from victims of the Black Death / K. I. Bos, V. J. Schuenemann, G. B. Golding [et al.] // *Nature*. — 2011. — Vol. 478. — P. 506—510.
13. Genotype of a historic strain of *Mycobacterium tuberculosis* / A. S. Bouwman, S. L. Kennedy, R. Müller [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 2012. — Vol. 109. — P. 18511—18516.
14. The rise and fall of the *Phytophthora infestans* lineage that triggered the Irish potato famine / K. Yoshida, V. J. Schuenemann, L. M. Cano [et al.] // *eLife*. — 2013. — Vol. 2. — P. e00731.
15. Ancient pathogen genomics as an emerging tool for infectious disease research / M. A. Spyrou, K. I. Bos, A. Herbig, J. Krause // *Nature Reviews Genetics*. — 2019. — Vol. 20. — P. 323—340.
16. Diverse plant and animal genetic records from Holocene and Pleistocene sediments / E. Willerslev, A. J. Hansen, J. Binladen [et al.] // *Science*. — 2003. — Vol. 300. — P. 791—795.
17. Pathogens and host immunity in the ancient human oral cavity / C. Warinner, J. F. M. Rodrigues, R. Vyas [et al.] // *Nature Genetics*. — 2014. — Vol. 46. — P. 336—344.
18. Establishing the validity of domestication genes using DNA from ancient chickens / F. L. Girdland, R. Allen, R. Barnett [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 2014. — Vol. 111. — P. 6184—6189.
19. Elephantid genomes reveal the molecular bases of woolly mammoth adaptations to the Arctic / V. J. Lynch, O. C. Bedoya-Reina, A. Ratan [et al.] // *Cell Reports*. — 2015. — Vol. 12. — P. 217—228.
20. Genomic estimation of complex traits reveals ancient maize adaptation to temperate North America / K. Swarts, R. M. Gutaker, B. Benz [et al.] // *Science*. — 2017. — Vol. 357. — P. 512—515.
21. Substitutions in woolly mammoth hemoglobin confer biochemical properties adaptive for cold tolerance / K. L. Campbell, J. E. E. Roberts, L. N. Watson [et al.] // *Nature Genetics*. — 2010. — Vol. 42. — P. 536—540.
22. *Callaway, E.* Mammoth genomes provide recipe for creating Arctic elephants / E. Callaway // *Nature*. — 2015. — Vol. 521. — P. 18—19.
23. Evolutionary history of the extinct Sardinian dhole / M. M. Ciucani, D. Palumbo, M. Galaverni [et al.] // *Current Biology*. — 2021. — Vol. 31. — P. 5571—5579.
24. Genetic data from the extinct giant rat from Tenerife (Canary Islands) points to a recent divergence from mainland relatives / P. Renom, L. Miralles, O. Garcia-Rodriguez [et al.] // *Biology Letters*. — 2021. — Vol. 17. — P. 20210533.

25. Status and relationships of the extinct giant Canary Island lizard *Gallotia goliath* (Reptilia: Lacertidae), assessed using ancient mtDNA from its mummified remains / N. Maca-Meyer, S. Carranza, J. C. Rando [et al.] // *Biological Journal of the Linnean Society*. — 2003. — Vol. 80. — P. 659—670.
26. Partial genomic survival of cave bears in living brown bears / A. Barlow, J. A. Cahill, S. Hartmann [et al.] // *Nature Ecology & Evolution*. — 2018. — Vol. 2. — P. 1563—1570.
27. Ancient wolf genome reveals an early divergence of domestic dog ancestors and admixture into high-latitude breeds / P. Skoglund, E. Ersmark, E. Palkopoulou, L. Dalén // *Current Biology*. — 2015. — Vol. 25. — P. 1515—1519.
28. *Shapiro, B.* Beringia as an Ice Age genetic museum / B. Shapiro, A. Cooper // *Quaternary Research*. — 2003. — Vol. 60. — P. 94—100.
29. Sequencing the nuclear genome of the extinct woolly mammoth / W. Miller, D. I. Drautz, A. Ratan [et al.] // *Nature*. — 2008. — Vol. 456. — P. 387—390.
30. Ancient pathogen DNA in human teeth and petrous bones / A. Margaryan, H. B. Hansen, S. Rasmussen [et al.] // *Ecology and Evolution*. — 2018. — Vol. 8. — P. 3534—3542.
31. Archaeological supplement A to Damgaard et al. 2018: Archaeology of the Caucasus, Anatolia, Central and South Asia 4000–1500 BCE / K. Kristiansen, B. Hemphill, G. Barjamovic [et al.] // *Zenodo*. — 2018.
32. DNA content and distribution in ancient feathers and potential to reconstruct the plumage of extinct avian taxa / N. J. Rawlence, J. R. Wood, K. N. Armstrong, A. Cooper // *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. — 2009. — Vol. 276. — P. 3395—3402.
33. Molecular and morphological analyses of avian eggshell excavated from a late thirteenth century earth oven / C. L. Oskam, C. Jacomb, M. E. Allentoft [et al.] // *Journal of Archaeological Science*. — 2011. — Vol. 38. — P. 2589—2595.
34. Ancient DNA analysis identifies marine mollusc shells as new metagenomic archives of the past / C. Der Sarkissian, V. Pichereau, C. Dupont [et al.] // *Molecular Ecology Resources*. — 2017. — Vol. 17. — P. 835—853.
35. *Höss, M.* DNA extraction from Pleistocene bones by a silica-based purification method / M. Höss, S. Pääbo // *Nucleic Acids Research*. — 1993. — Vol. 21. — P. 3913—3914.
36. *Rohland, N.* Ancient DNA extraction from bones and teeth / N. Rohland, M. Hofreiter // *Nature Protocols*. — 2007. — Vol. 2. — P. 1756—1762.
37. Ancient DNA analysis / L. Orlando, R. Allaby, P. Skoglund [et al.] // *Nature Reviews Methods Primers*. — 2021. — Vol. 1, no. 14.

References

1. Reich D., Green R. E., Kircher M. et al. Genetic history of an archaic hominin group from Denisova Cave in Siberia. *Nature*, 2010, vol. 468, pp. 1053—1060. DOI: 10.1038/nature09710
2. Green R. E., Krause J., Briggs A. W. et al. A draft sequence of the Neandertal genome. *Science*, 2010, vol. 328, pp. 710—722. DOI: 10.1126/science.1188021
3. Meyer M., Kircher M., Gansauge M.-T. et al. A high-coverage genome sequence from an archaic Denisovan individual. *Science*, 2012, vol. 338, pp. 222—226. DOI: 10.1126/science.1224344
4. Prüfer K., Racimo F., Patterson N. et al. The complete genome sequence of a Neanderthal from the Altai Mountains. *Nature*, 2013, vol. 505, pp. 43—49. DOI: 10.1038/nature12886
5. Sorenson M. D., Cooper A., Paxinos E. E. et al. Relationships of the extinct moa-nalos, flightless Hawaiian waterfowl, based on ancient DNA. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 1999, vol. 266, pp. 2187—2193. DOI: 10.1098/rspb.1999.0907
6. Greenwood D., Castresana J., Feldmaier-Fuchs G., Pääbo S. A molecular phylogeny of two extinct sloths. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2001, vol. 18, pp. 94—103. DOI: 10.1006/mpev.2000.0860
7. Shapiro B., Sibthorpe D., Rambaut A. et al. Flight of the dodo. *Science*, 2002, vol. 295, p. 1683. DOI: 10.1126/science.295.5560.1683
8. Cahill J. A., Stirling I., Kistler L. et al. Genomic evidence of widespread admixture from polar bears into brown bears during the last ice age. *Molecular Biology and Evolution*, 2018, vol. 35, pp. 1120—1129. DOI: 10.1093/molbev/msy018
9. Orlando L., Ginolhac A., Zhang G. et al. Recalibrating *Equus* evolution using the genome sequence of an early Middle Pleistocene horse. *Nature*, 2013, vol. 499, pp. 74—78. DOI: 10.1038/nature12323
10. Palkopoulou E., Mallick S., Skoglund P. et al. Complete genomes reveal signatures of demographic and genetic declines in the woolly mammoth. *Current Biology*, 2015, vol. 25, pp. 1395—1400. DOI: 10.1016/j.cub.2015.04.007
11. Seersholm F. V., Pedersen M. W., Sjøe M. J. et al. Rapid range shifts and megafaunal extinctions associated with late Pleistocene climate change. *Nature Communications*, 2020, vol. 11, p. 2770. DOI: 10.1038/s41467-020-16502-3
12. Bos K. I., Schuenemann V. J., Golding G. B. et al. A draft genome of *Yersinia pestis* from victims of the Black Death. *Nature*, 2011, vol. 478, pp. 506—510. DOI: 10.1038/nature10549

13. Bouwman A. S., Kennedy S. L., Müller R. et al. Genotype of a historic strain of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012, vol. 109, pp. 18511—18516. DOI: 10.1073/pnas.1209444109
14. Yoshida K., Schuenemann V. J., Cano L. M. et al. The rise and fall of the *Phytophthora infestans* lineage that triggered the Irish potato famine. *eLife*, 2013, vol. 2, p. e00731. DOI: 10.7554/eLife.00731
15. Spyrou M. A., Bos K. I., Herbig A., Krause J. Ancient pathogen genomics as an emerging tool for infectious disease research. *Nature Reviews Genetics*, 2019, vol. 20, pp. 323—340. DOI: 10.1038/s41576-019-0119-1
16. Willerslev E., Hansen A. J., Binladen J. et al. Diverse plant and animal genetic records from Holocene and Pleistocene sediments. *Science*, 2003, vol. 300, pp. 791—795. DOI: 10.1126/science.1084114
17. Warinner C., Rodrigues J. F. M., Vyas R. et al. Pathogens and host immunity in the ancient human oral cavity. *Nature Genetics*, 2014, vol. 46, pp. 336—344. DOI: 10.1038/ng.2906
18. Girdland F. L., Allen R., Barnett R. et al. Establishing the validity of domestication genes using DNA from ancient chickens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2014, vol. 111, pp. 6184—6189. DOI: 10.1073/pnas.1308939110
19. Lynch V. J., Bedoya-Reina O. C., Ratan A. et al. Elephantid genomes reveal the molecular bases of woolly mammoth adaptations to the Arctic. *Cell Reports*, 2015, vol. 12, pp. 217—228. DOI: 10.1016/j.celrep.2015.06.027
20. Swarts K., Gutaker R. M., Benz B. et al. Genomic estimation of complex traits reveals ancient maize adaptation to temperate North America. *Science*, 2017, vol. 357, pp. 512—515. DOI: 10.1126/science.aam9425
21. Campbell K. L., Roberts J. E. E., Watson L. N. et al. Substitutions in woolly mammoth hemoglobin confer biochemical properties adaptive for cold tolerance. *Nature Genetics*, 2010, vol. 42, pp. 536—540. DOI: 10.1038/ng.574
22. Callaway E. Mammoth genomes provide recipe for creating Arctic elephants. *Nature*, 2015, vol. 521, pp. 18—19. DOI: 10.1038/521018a
23. Ciucani M. M., Palumbo D., Galaverni M. et al. Evolutionary history of the extinct Sardinian dhole. *Current Biology*, 2021, vol. 31, pp. 5571—5579. DOI: 10.1016/j.cub.2021.09.033
24. Renom P., Miralles L., Garcia-Rodriguez O. et al. Genetic data from the extinct giant rat from Tenerife (Canary Islands) points to a recent divergence from mainland relatives. *Biological Letters*, 2021, vol. 17, p. 20210533. DOI: 10.1098/rsbl.2021.0533
25. Maca-Meyer N., Carranza S., Rando J. C. et al. Status and relationships of the extinct giant Canary Island lizard *Gallotia goliath* (Reptilia: Lacertidae), assessed using ancient mtDNA from its mummified remains. *Biological Journal of the Linnean Society*, 2003, vol. 80, pp. 659—670. DOI: 10.1111/j.1095-8312.2003.00265.x
26. Barlow A., Cahill J. A., Hartmann S. et al. Partial genomic survival of cave bears in living brown bears. *Nature Ecology & Evolution*, 2018, vol. 2, pp. 1563—1570. DOI: 10.1038/s41559-018-0654-8
27. Skoglund P., Ersmark E., Palkopoulou E., Dalén L. Ancient wolf genome reveals an early divergence of domestic dog ancestors and admixture into high-latitude breeds. *Current Biology*, 2015, vol. 25, pp. 1515—1519. DOI: 10.1016/j.cub.2015.04.019
28. Shapiro B., Cooper A. Beringia as an Ice Age genetic museum. *Quaternary Research*, 2003, vol. 60, pp. 94—100. DOI: 10.1016/S0033-5894(03)00009-7
29. Miller W., Drautz D. I., Ratan A. et al. Sequencing the nuclear genome of the extinct woolly mammoth. *Nature*, 2008, vol. 456, pp. 387—390. DOI: 10.1038/nature07446
30. Margaryan A., Hansen H. B., Rasmussen S. et al. Ancient pathogen DNA in human teeth and petrous bones. *Ecology and Evolution*, 2018, vol. 8, pp. 3534—3542. DOI: 10.1002/ece3.3924
31. Kristiansen K., Hemphill B., Barjamovic G. et al. Archaeological supplement A to Damgaard et al. 2018: Archaeology of the Caucasus, Anatolia, Central and South Asia 4000—1500 BCE. *Zenodo*, 2018. DOI: 10.5281/zenodo.1240521
32. Rawlence N. J., Wood J. R., Armstrong K. N., Cooper A. DNA content and distribution in ancient feathers and potential to reconstruct the plumage of extinct avian taxa. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2009, vol. 276, pp. 3395—3402. DOI: 10.1098/rspb.2009.0755
33. Oskam C. L., Jacomb C., Allentoft M. E. et al. Molecular and morphological analyses of avian eggshell excavated from a late thirteenth century earth oven. *Journal of Archaeological Science*, 2011, vol. 38, pp. 2589—2595. DOI: 10.1016/j.jas.2011.05.006
34. Der Sarkissian C., Pichereau V., Dupont C. et al. Ancient DNA analysis identifies marine mollusc shells as new metagenomic archives of the past. *Molecular Ecology Resources*, 2017, vol. 17, pp. 835—853. DOI: 10.1111/1755-0998.12679
35. Höss M., Pääbo S. DNA extraction from Pleistocene bones by a silica-based purification method. *Nucleic Acids Research*, 1993, vol. 21, pp. 3913—3914. DOI: 10.1093/nar/21.16.3913
36. Rohland N., Hofreiter M. Ancient DNA extraction from bones and teeth. *Nature Protocols*, 2007, vol. 2, pp. 1756—1762. DOI: 10.1038/nprot.2007.247
37. Orlando L., Allaby R., Skoglund P. et al. Ancient DNA analysis. *Nature Reviews Methods Primers*, 2021, vol. 1, no. 14. DOI: 10.1038/s43586-020-00011-0

Поступила в редакцию 23.06.2025.