

## СРАВНЕНИЕ МЕТОДИК ВЫДЕЛЕНИЯ ФРАГМЕНТОВ ДНК ГОЛУБИКИ ВЫСОКОЙ ИЗ АГАРОЗНОГО ГЕЛЯ

*Пасовец Маргарита Вадимовна, магистрант  
Водчиц Наталья Васильевна, зав. НИЛ КТР  
Волкова Елена Михайловна, к.с./х.н., доцент  
Полесский государственный университет*

Введение. Метод электрофореза основан на разделении (фрагментов) молекул ДНК, движущихся с различной скоростью в электрическом поле. С помощью данного метода в агарозном геле фрагменты ДНК, различающиеся по размеру легко разделить, а затем исследовать каждый отдельно. Агарозный гель образует трехмерную полимерную ячеистую структуру, электронейтрален, химически инертен по отношению к ДНК. Благодаря этим свойствам легко можно выделить необходимый фрагмент ДНК с сохранением его биологической активности [4, с. 17].

Элюирование фрагментов ДНК из агарозных гелей – это стандартный метод, который часто используется в молекулярной биологии. Хотя существует ряд протоколов и коммерческих наборов, доступных для выделения фрагментов ДНК из агарозных гелей, может возникать ряд трудностей таких как: извлечение малого количества ДНК, недостаточное удаление ингибирующих веществ, присутствующих в агарозе, а также соосаждение агарозы с ДНК [6, с. 2862].

Цель работы – сравнение двух методик выделения фрагментов ДНК голубики высокой из агарозного геля.

Методика и объекты исследований. Исследования были проведены на базе научно–исследовательской лаборатории прикладной и фундаментальной биотехнологии биотехнологического факультета учреждения образования “Полесский государственный университет” (далее БТФ ПолесГУ). В качестве исследуемых объектов использовали ткани голубики высокой, сортов Bluesgor, Northland, Bluejay, произведенные методом клонального микроразмножения *in vitro* на базе научно–исследовательской лаборатории клеточных технологий в растениеводстве БТФ ПолесГУ.

ДНК выделяли протоколом «ЦТАБ–PVP–меркапроэтонол» [1, с.116] Измерение концентрации ДНК проводили по стандартной методике на спектрофотометре NanoDrop 1000, в диапазоне длин волн 220–350 нм.

Реакционная смесь с праймером UBC 818 для проведения ISSR–ПЦР готовилась в объеме 25 мкл и включала стандартные компоненты [1, с. 116].

Длину фрагментов амплифицированной ДНК оценивали с помощью горизонтального электрофореза в 2% агарозном геле. В дальнейшем, выяв-

ленный у всех сортов, мономорфный фрагмент длиной 450 п.н. элюировали двумя методиками: через иглу и с помощью центрифугирования.

Реампликоны использовали в качестве ДНК–матрицы в повторных ISSR–ПЦР–реакциях.

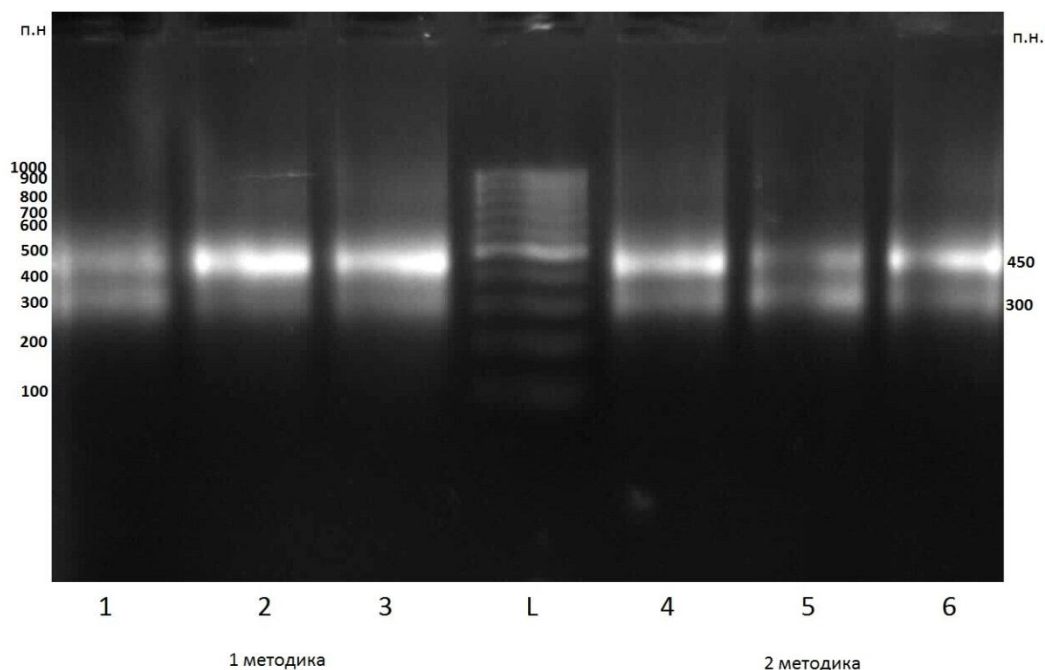
Результаты и их обсуждение. В соответствии с техническими возможностями нашей лаборатории для выделения фрагментов ДНК из агарозного геля были протестированы следующие методики: выделение фрагмента ДНК из геля через иглу и метод элюции ДНК из агарозного геля с помощью центрифугирования [2, с. 79; 3, с. 155]. Данные методы достаточно доступны и не требуют затрат большого количества времени. Концентрация и очистка ДНК, выделенной двумя методиками, приведена в таблице. Значения для ДНК, полученной первым способом (методом иглы) более низкие. Возможно, это связано с тем, что даже через иглу 26 калибра вместе с растворенной ДНК в пробирку попадает небольшое количество агарозного геля.

Таблица – Спектрофотометрические характеристики образцов ДНК

	1 метод		2 метод	
	Конц (нг/мкл)	Степень очистки $\lambda$ 260/280	Конц (нг/мкл)	Степень очистки $\lambda$ 260/280
Bluecrop	27.0	1.65	33.4	1.78
Northland	26.3	1.68	90.4	1.76
Bluejay	40.6	1.66	39.8	1.79

В дальнейшем элюированные фрагменты подвергали обогащению через повторную амплификацию и проводили электрофоретический анализ. При наличии маркеров известной молекулярной массы возможно определение размера фрагмента ДНК. На полученной электрофореграмме помимо фрагмента 450 п.н. наблюдали еще один – длиной 300 п.н.. Это можно объяснить тем, что изначально фрагмент ДНК не разделился по размеру.

При сравнительном анализе ISSR–ПЦР–профилей видно, что для фрагментов, выделенных второй методикой, характерны четкие контуры (свидетельствует об отсутствии примесей и остатков геля). Профили, полученные с помощью первой методики, более размытые (рис.).



**Рисунок – Электрофореграмма ISSR–фрагмента 450 п.н. (праймер UBC 818) для сортов голубики: 1,4 – Bluecrop; 2,5 – Northland; 3,6– Bluejay. L – размерный стандарт (п.н.). 1 методика – выделение фрагмента ДНК из геля через иглу, 2 методика – выделение фрагмента ДНК из агарозного геля с помощью центрифугирования.**

**Вывод.** По результатам исследований можно сделать вывод, о том, что обе методики могут использоваться для элюирования ДНК последовательностей. Но более эффективной является метод элюции ДНК из агарозного геля с помощью центрифугирования. В дальнейшем полученные реампликоны могут использоваться в различных молекулярно–биологических исследованиях, например как CAPS–анализ и создание SCAR–маркеров на основе уникальных последовательностей ДНК.

#### **Список использованных источников**

1. Водчиц, Н.В. Применение ISSR–маркеров для генетической паспортизации и сертификации растений рода *Vaccinium* / Н.В. Водчиц // Весці НАНБ. Сер. біял. Навук. – 2016. – № 3.– С. 115–120.
2. Методы работы с ДНК / Методическое пособие / Н.А. Глинская [и др.] – Пинск: ПолесГУ, 2017. – 88 с.
3. Остерман, Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: электрофорез и ультрацентрифугирование: практ. пособие / Л.А. Остерман. – М.: Наука, 1981. – 288 с.
4. Сельскохозяйственная биотехнология: учебник для вузов / В. С. Шевелуха [и др.]; под ред. В. С. Шевелухи. – 2–е изд., перераб. и доп. – М. : Высш. Шк., 2003. – 469 с.
5. Wang, Z. Isolation of DNA fragments from agarose gel by centrifugation / Z. Wang, T.G. Rossman // Nucleic Acids Research. – 1994. – Vol. 22, No. 14. – P. 2862 – 2863