

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ДВУХ МЕТОДИК ОПРЕДЕЛЕНИЯ РАЗМЕРА ISSR-ФРАГМЕНТОВ ДНК СОРТОВОЙ ГОЛУБИКИ

А.О. Кузьменчук, 3 курс

Научный руководители – Н.В. Водчиц, зав. ОЛ

“ДНК и клеточных технологий в растениеводстве и животноводстве”;

А.Д. Кульговеня, ассистент

Полесский государственный университет

Голубика, как и другие представители семейства брусничных, является ценной ягодной культурой. Ее плоды – диетический гипоаллергенный продукт, обладающий рекордно высокой антиоксидантной активностью [1, с. 23].

ISSR-ПЦР-метод обладает высокой разрешающей способностью для оценки отношений между сортами и гибридами растений. Метод основан на анализе участков ДНК, расположенных между микросателлитными повторами, диспергированными по всему растительному геному, и обеспечивает воспроизводимый результат при детекции большого числа локусов. Полученные размеры фрагментов ДНК используют для оценки генетической изменчивости между сортами и создания дендрограмм генетического сходства, поэтому точность определения маркера имеет большое значение [2, с. 18].

**Цель работы:** сравнение двух методик обработки данных ISSR-анализа ДНК голубики высокорослой.

Исследования были проведены на базе отраслевой лаборатории “ДНК и клеточных технологий в растениеводстве и животноводстве”.

Объектом исследования являлись ISSR-маркеры шести сортов голубики, произведенной методом клонального микроразмножения *in vitro* на базе отраслевой лаборатории.

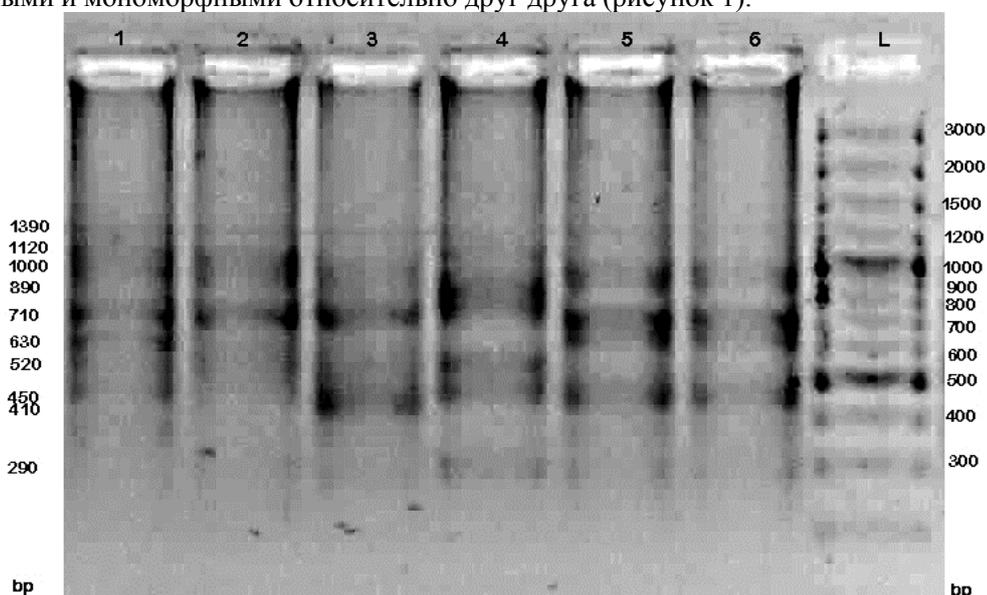
Реакционная смесь для проведения ПЦР с праймером UBC 818 готовилась по стандартной методике [3, с. 67–68]. Полимеразные цепные реакции проводились в термоциклере TC–1000G.

Длину фрагментов амплифицированной ДНК оценивали с помощью горизонтального электрофореза в 2 % агарозном геле, в 1х буфере, при стартовом напряжении 90 В и основном напряжении фореза 50 В, в течение 120 мин. Окраска ДНК осуществлялась бромистым этидием, вносимым в гель в концентрации 5 мкг/мл, до застывания геля [3, с. 71].

Визуализация результатов электрофореза проводилась в приборе гель-документирования Quantum ST4 [3, с. 75]. Для окончательной обработки ISSR-профилей применялась программа Adobe Photoshop PS v.12. Для сопоставления профилей применялся инструмент “горизонтальные направляющие”. Для определения размера фрагментов применялся метод создания калибровочного графика на миллиметровой бумаге и в программе Microsoft Excel.

При построении калибровочной кривой на миллиметровой бумаге был выбран масштаб: одна клетка равна одному миллиметру. На оси У отмечали стандарты размера фрагментов ДНК. Линейкой измеряли расстояние от стартовой точки до тех же маркеров на экране и переносили на ось Х. Отмечали точки пересечения на графике [3, с. 75].

Учитывалось 10 амплифицированных фрагментов в пределах 290–1390 п.н. Из общего числа ISSR-фрагментов голубики: 2 можно считать уникальными (410 и 890 п.н.) для данного профиля; 2 – мономорфны (1390, 710 п.н.); остальные маркеры (1120, 1000, 630, 520, 450, 290 п.н.) могут быть полиморфными и мономорфными относительно друг друга (рисунок 1).



**Рисунок 1.** – Электрофореграмма ISSR-продуктов для сортов голубики с праймером UBC 818, размеры которых определены методом создания калибровочного графика на миллиметровой бумаге.

**Сорта: 1 – Нуи, 2 – Драпер, 3 – Эрлиблю, 4 – Нортланд, 5 – Нортблю, 6 – Норткантри. L – стандарт длин фрагментов (bp)**

При определении размера фрагментов в программе Microsoft Excel выбирали необходимый диапазон ячеек и вводили полученные данные для создания точечной диаграммы. Добавляли названия осей диаграммы и “Дополнительные параметры”. С помощью появившегося уравнения находили длины фрагментов амплифицированных образцов ДНК. Полученные значения переносили на калибровочный график [4].

Те же амплифицированные фрагменты имели следующие размеры: 266, 411, 441, 522, 640, 732, 867, 1027, 1136, 1392 п.н. (рисунок 2).

Разница до 10 нуклеотидов может быть из-за специфики агарозного геля. Средняя длина разделяемых фрагментов ДНК в нем соответствует 0,1–2 т.п.н. [5, с. 18].

Различие в 10–30 нуклеотидов возникает из-за неточности измерения длины от направляющей до маркера. Линейка имеет погрешности при измерениях малых расстояний, которые более подвержены риску ошибок и неточностей.

Также работа с миллиметровой бумагой может привести к искажению результатов из-за усталости и потери концентрации.

Расчет значений	
X	Y
8,1	266
6,8	412
6,6	441
6,1	522
5,5	640
5,1	732
4,6	867
4,1	1027
3,8	1136
3,2	1392

**Рисунок 2. – ISSR-маркеры для сортов голубики с праймером UBC 818, определенные в программе Microsoft Excel**

Методика с использованием программы Microsoft Excel является более практичной. С ее помощью затрачивается меньше времени. Анализ обладает более низкой вероятностью возникновения ошибок и неточностей, учитывая подход математического уравнения.

Для обработки данных ПЦР-анализа можно использовать обе методики. Применение программы Microsoft Excel обладает некоторыми преимуществами: практична в использовании, позволяет редактировать графики, дает возможность работать с большими объемами данных, предлагает множество функций и инструментов, которые могут быть полезны при создании калибровочного графика.

### **Список использованных источников**

1. Оптимизация условий культивирования голубики высокой *Vaccinium corymbosum* L. *in vitro*. Голубиководство в Беларуси: итоги и перспективы : материалы Респ. науч.-практ. конф., Минск, 17 августа 2012 г. ; редкол. : В. В. Титок [и др.]. – Минск, 2012. – 23–26 с.
2. Кавцевич, В. Н. Оценка генетической разнородности линий томата на основе технологии ISSR-PCR / В. Н. Кавцевич [и др.]. – Минск : Весці БДПУ, 2013. – 18–23 с. – (Серия №3 ; вып. 3).
3. Глинская Н. А. Методы работы с ДНК : метод. пособие / Н. А. Глинская [и др.]. – Пинск : ПолесГУ, 2017. – 88 с.
4. Как сделать линейную калибровочную кривую в Excel [Электронный ресурс] / Программа Microsoft Excel. – Режим доступа: <https://tutorybird.ru/excel/kak-sdelat-linejnuyu-kalibrovochnuyu-k/>. – Дата доступа: 05.04.2024.
5. Каюмов А. Р. Практикум по молекулярной генетике : учеб.-метод. пособие / А.Р. Каюмов, О. А. Гимадудинов. – Казань : КФУ, 2016. – 36 с.