

**Министерство сельского хозяйства Российской Федерации
Департамент научно-технологической политики и образования
ФГБОУ ВО «Донской государственный аграрный университет»**

*Лаборатория молекулярной диагностики и биотехнологии
сельскохозяйственных животных*

**Молекулярно-генетические исследования сельскохозяйственных
животных методом ПЦР-ПДРФ
Учебное пособие**



Персиановский
2018

УДК 636:575.006.25

ББК 45/46

М75

Рецензенты: Третьякова О.Л., д-р с.-х. наук, профессор Донской ГАУ;
Колосов А.Ю., к.с.-х. наук., доцент Донской ГАУ

Авторы: Гетманцева Л.В., Клименко А.И., Василенко В.Н.,
Колосова М.А., Бакоев Н.Ф.

М75

Молекулярно-генетические исследования сельскохозяйственных животных методом ПЦР-ПДРФ : учебное пособие / Л.В. Гетманцева [и др.] ; Донской ГАУ. – Персиановский : Донской ГАУ, 2018. – 119 с.

В учебном пособии изложен материал по современным биотехнологическим методам в области животноводства, в том числе, основанный на практической деятельности сотрудников лаборатории молекулярной диагностики и биотехнологии с.-х. животных Донского ГАУ. Приведены теоретические и практические аспекты использования ДНК технологий в селекции с.-х. животных. Представлен лабораторный практикум для освоения и закрепления методов ПЦР диагностики. Учебное пособие предназначено для подготовки бакалавров по направлению 36.03.02 «Зоотехния», 35.03.07 «Технология производства и переработки сельскохозяйственной продукции», магистров 36.04.02 «Зоотехния» и аспирантов по направлению 06.02.07 «Разведение, селекция и генетика сельскохозяйственных животных» всех форм обучения.

УДК 636:575.006.25

ББК 45/46

Учебное пособие рассмотрено, одобрено и рекомендовано к изданию методическим советом Донского ГАУ(№2 от 29.03.2018г.)

© Гетманцева Л.В., Клименко А.И.,
Василенко В.Н., Колосова М.А., Бакоев
Н.Ф., 2018

© Донской государственный аграрный
университет, 2018

СОДЕРЖАНИЕ

	Стр.
Введение	5
1. Теоретические аспекты молекулярно-генетических методов в животноводстве	6
1.1. История открытия нуклеиновых кислот	6
1.2. Секвенирование геномов высших организмов	24
1.3. ДНК-маркеры и маркер-зависимая селекция с.-х. животных	32
2. Создание биокolleкции племенных ресурсов с.-х. животных	41
2.1. Коллекция биологического материала лаборатории молекулярной диагностики и биотехнологии с/х животных	46
3. Технология диагностики аллельных вариантов целевых генов с.-х. животных методом ПЦР и ПЦР-ПДРФ	47
3.1. Сбор и подготовка исследуемых образцов	47
3.2. Выделение нуклеиновых кислот	48
3.3. Полимеразная цепная реакция (ПЦР)	49
3.4. Основные компоненты реакционной смеси ПЦР	52
3.5. Программа амплификации	58
3.6. Модификации ПЦР метода	60
3.7. Основные виды полимераз	71
3.8. Метод ПЦР-ПДРФ	74
3.9. Эндонуклеазы рестрикции (рестриктазы)	76
3.10. Детекция продуктов амплификации	78
3.11. Принцип метода электрофореза	79
3.12. Основное оборудование для проведения исследований методом ПЦР и ПЦР-ПДРФ	84
4. ЛАБОРАТОРНЫЙ ПРАКТИКУМ	99
4.1. Лабораторная работа №1	100

	Выделение ДНК с помощью набора DIAtom™ DNAPrep	
4.2.	Лабораторная работа №2	103
	Выделение ДНК с помощью набора ДНК-Экстран-2	
4.3.	Лабораторная работа №3	106
	Выделение ДНК на колонках «К-СОРБ-100»	
4.4.	Лабораторная работа №4	108
	Постановка полимеразной цепной реакции	
4.5.	Лабораторная работа №5	110
	Рестрикция ПЦР-фрагмента ДНК	
4.6.	Лабораторная работа №6	113
	Гель-электрофорез ДНК	
	Список литературы	117

ВВЕДЕНИЕ

Основополагающей проблемой повышения эффективности селекционного процесса является изучение детерминант формирования высокой продуктивности с.-х. животных. При абсолютно равных условиях внешней среды фенотипические различия (хозяйственно ценные признаки) оцениваемых животных будут в большей степени соответствовать их молекулярно-генетическим различиям, то есть лучшие по показателям собственной продуктивности животные в данном случае будут обладать и лучшими генами, а также определенной их комбинацией, определяющей эту продуктивность. Однако в потомстве этих животных не обязательно будет столь же высокая продуктивность, поскольку в процессе образования гамет удачная комбинация генов может разрушиться.

В этой связи при отборе животных необходимо оценить генетическую структуру и в дальнейшем рассчитать схемы подбора, для создания необходимых комбинаций. Молекулярно-генетические методы анализа, основанные на полиморфной природе ДНК, позволяют использовать определенные гены, контролирующие формирование экономически-значимых признаков с.-х. животных. Несмотря на то, что большинство селекционно-ценных показателей являются количественными признаками, за развитие и проявление которых отвечают многие гены, однако на сегодняшний день идентифицированы гены, имеющие выраженный эффект на фенотип животного. Такие гены принято называть целевыми генами и рассматривать в качестве ДНК-маркеров селекционных признаков с.-х. животных. Внедрение этих маркеров в селекционно-племенную работу позволяет использовать информацию о наследственном потенциале отбираемых животных, повысить точность оценки и эффективность селекции.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – это изящный метод, имитирующий естественную репликацию ДНК и позволяющий обнаружить единственную специфическую ДНК в присутствии миллионов других молекул. На основе использования ПЦР и рестрицирующих эндонуклеаз был разработан метод ПЦР-ПДРФ. В этом случае рестрикции подвергаются продукты амплификации, а не геномная ДНК. Метод ПЦР-ПДРФ приобрел большую популярность и широкую апробацию, в том числе при изучении последовательностей уникальных генов сельскохозяйственных животных, связанных с экономически значимыми признаками продуктивности.

1. ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ В ЖИВОТНОВОДСТВЕ

1.1. ИСТОРИЯ ОТКРЫТИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

На сегодняшний день молекула дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) представляет собой один из самых известных научных символов, а двойная спираль молекулы ДНК всесторонне исследуется в качестве носителя кода, который управляет развитием всего живого.

На сегодняшний день молекула дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) представляет собой один из самых известных научных символов, а двойная спираль молекулы ДНК всесторонне исследуется в качестве носителя кода, который управляет развитием всего живого. Открытие ДНК, как и практически все великие открытия, не было результатом работы одинокого гения, а увенчало собой длинную цепь экспериментальных работ.

Впервые дезоксирибонуклеиновую кислоту открыл молодой швейцарский врач Фридрих Мишер в 1869 году, работавший тогда в Германии. Он решил изучить химический состав клеток животных, а в качестве материала выбрал лейкоциты. В процессе работы он понял, что кроме белков в лейкоцитах присутствует какое-то загадочное соединение. Оно выпадало в осадок в виде белых хлопьев или нитей при подкислении раствора и снова растворялось при его подщелачивании. Ф. Мишер назвал его нуклеином (nucleus с лат. – ядро). Данное событие не стало сенсацией, не перевернуло мир и не сделало отца дезоксирибонуклеиновой кислоты знаменитым. Биологическая сущность молекулы была неясна и туманна, поначалу ей отвели скромную роль резервного хранилища фосфора в клетках организма. Только в 1963 году американский биолог Джеймс Уотсон и английский нейробиолог Френсис Крик расшифровали молекулу и

установили, что она служит базой данных, содержащей наследственную информацию.

Изначально, в качестве хранилища наследственной информации, более перспективнее выглядели белки. Предположение заключалось в том, что кодирование осуществляется структурой белка, составляющего каждый ген. Казалось вполне естественным, что если белок является сложной молекулой, то в нем и должна быть заключена информация, как создать эту молекулу. Такая схема казалась настолько естественной, что даже не подвергалась обсуждению. Однако исследования, направленные на изучение данной проблемы доказали неправомочность этой теории.

В 1896 году ученые обратили внимание на хромосомы и немецкий ученый Альбрехт Коссель занялся проведением экспериментов на материале спермы лосося. Он обнаружил, что значительную часть содержимого спермы лосося составляет нуклеиновая кислота - ее в сперме было в два раза больше, чем белка. Самое главное белок оказался не просто в меньшинстве, белковые молекулы удивили формулой. Вещество, которое ученый назвал протамином, состояло на 90% из одного вида аминокислоты – аргинина.

Несмотря на результаты работы А. Косселя, на молекулы нуклеиновой кислоты принято было смотреть свысока как на слишком простые и маленькие и химики продолжали изучать белки в надежде, что чрезмерной простоте протаминов найдется какое-то объяснение и что они в конечном итоге окажутся в достаточной степени сложными соединениями.

Однако, результаты исследований все больше заставляли внимательно взглянуть на нуклеиновую кислоту. Очередное открытие в 1928 году представило убедительные доказательства, что носителем генетического кода является только нуклеиновая кислота.

У одной бактерии, возбудителя пневмонии, есть два штамма. Клетки бактерий одного из них покрыты гладкой сахарообразной пленкой - этот штамм обозначается буквой S. Клетки бактерий другого штамма пленки не имеют, и этот штамм обозначается буквой R. В 1928 году выяснилось, что если партию убитых кипячением бактерий штамма S добавить в колонию живых бактерий штамма R, то в результате появятся живые бактерии штамма S! Мертвые S + Живые R → Живые S. Предположить, что мертвые бактерии S ожили, было просто невыносимо. Оставалось предположение о том, что бактерии S обладают неким геном, который управляет выработкой фермента, необходимого для формирования оболочки, а у бактерий R такого гена нет, а значит нет и фермента, и оболочки. В 1931 году выяснилось, что добавление мертвых бактерий в нетронутый R тоже не является обязательным для превращения R в S. Аналогичного эффекта удалось добиться с помощью экстракта бактерий. Соответственно экстракт мог содержать необходимый ген. Дальнейшие исследования позволили установить химический состав этого экстракта (гена) и в 1944 году трое ученых из Института Рокфеллера - Освальд Эйвери, Колин Мак-Леод и Маклин Мак-Карти - продемонстрировали, что носителем гена является нуклеиновая кислота, и только она. Им удалось превратить бактерии штамма R в бактерии штамма S с помощью одного лишь раствора нуклеиновых кислот, без белков! Позже появились и другие примеры превращения бактерий одного штамма в бактерии другого, и в каждом случае веществом, производившим подобную трансформацию, была нуклеиновая кислота. Сомнений не оставалось, что носителем генетического кода является только нуклеиновая кислота. Все эксперименты, проводимые начиная с 1944 года, указывали на это. Нуклеиновая кислота является носителем генетического кода всех видов живых существ, и клеток, и вирусов. Белок никогда не несет

этой информации. Так что с конца 1940-х годов химики переключили свой интерес на молекулы нуклеиновых кислот.

На момент обретения в 1944 году всемирной славы нуклеиновая кислота была уже известна химикам на протяжении трех четвертей века и тем немногим первопроходцам, которые работали над нуклеиновой кислотой и ранее, удалось установить важнейшие особенности ее строения.

Вскоре после открытия нуклеиновой кислоты стало известно, что в ее состав входит фосфор. Это многих удивило. Известно было, что некоторые белки тоже содержат фосфор, но в очень небольших количествах. Казеин - основной белок молока, содержит 1% фосфора. Лецитин, жирное вещество, находящееся в яичном желтке, состоит из фосфора на 3%. А в нуклеиновой кислоте этого элемента содержится 9%.

Практически с самого начала изучения нуклеиновой кислоты отмечалось, что в нее входят сахарные группы, но конкретная природа этих групп на протяжении десятилетий оставалась загадкой. Самый распространенный в природе, простой сахар - это глюкоза, материал, из которого строятся крахмал и целлюлоза. Молекула глюкозы представляет собой цепочку из шести атомов углерода, к пяти из которых прикреплены гидроксильные группы, а шестой входит в состав карбонильной группы. Именно наличие карбонильной группы и нескольких гидроксильных является характеризующей особенностью строения сахаров. В числе распространенных сахаров можно назвать фруктозу и галактозу. В их основе тоже лежит цепочка из шести атомов углерода, один из которых входит в карбонильную группу, а остальные связаны с гидроксильными группами. Различаются они относительной ориентацией гидроксильных групп в пространстве, что вполне достаточно для того, чтобы соединения имели различные химические свойства.

Все эти вещества - простые, сложные, или комбинированные, натуральные или синтетические - имеют общее название углеводы. Но какой именно углевод содержится в нуклеиновой кислоте? Ответ на этот вопрос появился в 1910 году, когда американский биохимик русского происхождения Фебюс Арон Теодор Левен впервые установил, что в состав нуклеиновой кислоты входит рибоза. До этого считалось, что рибоза в природе не встречается. В 1901 году ее синтезировал Эмиль Фишер (первооткрыватель структуры пептидов), однако решили, что это соединение - не более чем научный курьез, не имеющий практического значения.

Рибоза отличается от глюкозы, фруктозы и галактозы тем, что в ней не шесть, а пять атомов углерода. Эта пятизвенная углеродная цепочка стремится принять кольцевидную форму с помощью атома кислорода одной из гидроксильных групп. В результате получается кольцо из четырех атомов углерода и одного атома кислорода (рисунок 1).

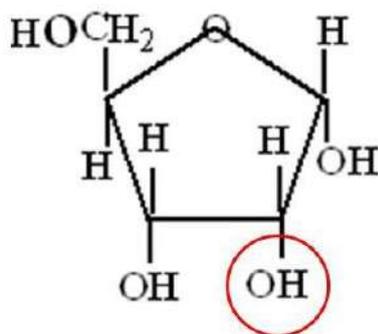


Рисунок 1. Молекула рибозы

Позже Левен обнаружил, что не все молекулы нуклеиновой кислоты содержат рибозу. В некоторых вместо нее имеется близкий к рибозе сахар, отличающийся лишь отсутствием одного из атомов кислорода. Соответственно химическое название этого сахара - дезоксирибоза, а строение его показано на рисунке 2. Дезоксирибозу,

как и рибозу, Фишер синтезировал за несколько лет до того, как ее обнаружили в природе.

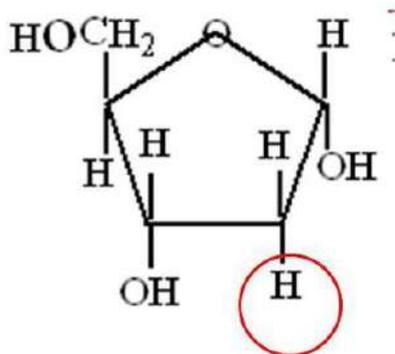


Рисунок 2. Молекула дезоксирибозы

По принципу наличия одного из этих двух сахаров нуклеиновые кислоты разделили на два подвида: рибонуклеиновая кислота и дезоксирибонуклеиновая кислота. Поскольку эти названия стали упоминаться все чаще, в широкое употребление вошли сокращенные наименования этих веществ - рибонуклеиновая кислота стала РНК, а дезоксирибонуклеиновая - ДНК.

Кроме рибозы и дезоксирибозы, никаких других сахаров в нуклеиновых кислотах больше не обнаружилось, и за 1950-е годы биохимики пришли к выводу, что и не обнаружится. Соответственно единственно встречающимися в нуклеиновой кислоте сахарами являются рибоза и дезоксирибоза.

Нуклеиновая кислота того или другого вида встречается в определенных участках клетки. ДНК находится исключительно в ядре - если быть совершенно точным, то именно в хромосомах. РНК тоже можно найти в ядре, но большая часть ее сосредоточена в цитоплазме.

Кроме фосфатных групп и сахаров, в нуклеиновых кислотах были обнаружены также соединения атомов, сгруппированных вокруг азотсодержащих колец. Этот факт установил Альбрехт Коссель в своих экспериментах в 1880-х годах. Все выделенные

азотсодержащие соединения оказались выстроенными вокруг одной из двух кольцевых систем - пуринового кольца или пиримидинового кольца.

Атомы углерода имеют склонность к образованию колец. Комбинации, основанные на этих кольцах, чрезвычайно стабильны, особенно если кольца составлены из пяти-шести атомов, а стабильнее всего они в тех случаях, когда звенья кольцевой цепи соединены попеременно то одинарными, то двойными связями. Самый лучший пример приведен на рисунке 3. Это молекула бензола. Ядро ее состоит из шести атомов углерода, каждое из которых соединено с одним из соседних атомов углерода одинарной связью, а с другим - двойной. Четвертая валентность каждого атома занята атомом водорода.

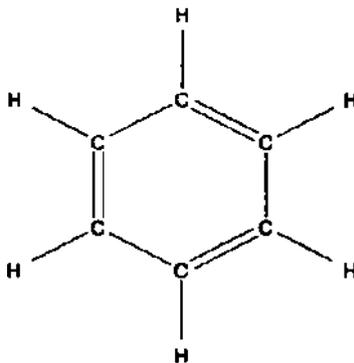


Рисунок 3. Молекула бензола

Кольцо из шести атомов углерода, в котором чередуются двойные и одинарные связи, называется бензольным кольцом (рисунок 4). Оно настолько стабильно, что его обнаруживают в тысячах соединений. Иногда атомное кольцо состоит не только из атомов углерода. Могут использоваться и другие атомы, обычно это азот или кислород. Кольца могут состоять из пяти звеньев и включать в себя не только углерод. Например, имидазол - это пятизвенное кольцо с двумя атомами азота. Кроме того, атомы углерода (не исключая их сочетаний с небольшим числом других атомов) способны

образовывать не только простые кольца, но и комбинации колец. Так пиримидиновое кольцо состоит из четырех атомов углерода и двух атомов азота, а пуриновое кольцо представляет собой комбинацию пиримидинового и имидазольного колец (рисунок 4).

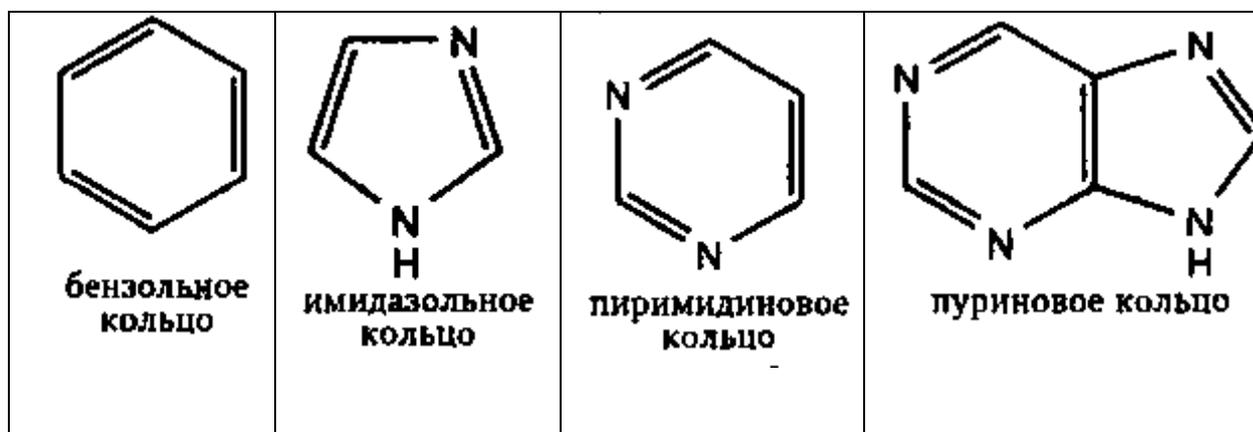
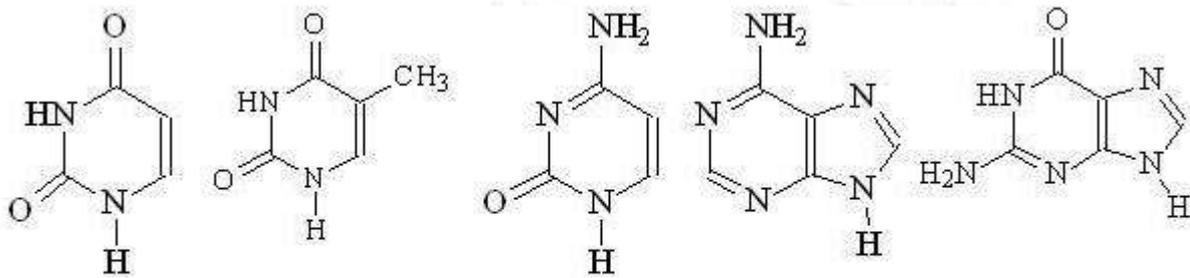


Рисунок 4. Кольца из шести и пяти атомов углерода

При изучении нуклеиновых кислот в больших количествах были выделены два вида производных пурина и три пиримидина. Пурины - это аденин и гуанин, а пиримидины - цитозин, тимин и урацил (рисунок 5). Три из этих пяти соединений - аденин, гуанин и цитозин - присутствуют как в ДНК, так и в РНК. Тимин встречается только в ДНК, а урацил - только в РНК. Между собой эти два последних пиримидина различаются тем, что у тимина есть метиловая группа, а у урацила нет.

Итак, были установлены все составляющие нуклеиновой кислоты: фосфатная группа, рибоза и дезоксирибоза, два пурина и три пиримидина. Но что их удерживает вместе?



Урацил (У) Тимин (Т) Цитозин (Ц) Аденин (А) Гуанин (Г)

Рисунок 5. Азотистые основания, входящие в состав нуклеиновых кислот

Левен установил, что в рибозной или дезоксирибозной составляющей каждой молекулы нуклеиновой кислоты имеется фосфатная группа, с одной стороны, и пурин или пиримидин - с другой. Эти соединения получили название нуклеотиды.

В составе РНК все нуклеотиды содержат рибозную группу и одно из четырех соединений: аденин, гуанин, цитозин или урацил. Таким образом, формируются четыре различных нуклеотида: адениловая кислота, гуаниловая кислота, цитидиловая кислота и уридиловая кислота. Кислотные свойства каждой из них придает присутствие фосфатной группы, а из названия каждого нуклеотида ясно, какой именно пурин или пиримидин в нем присутствует.

Нуклеотиды ДНК отличаются наличием дезоксирибозы, соответственно имеем дезоксиадениловую кислоту, дезоксигуаниловую кислоту, дезоксицитидиловую кислоту и дезокситимидиловую кислоту.

Все различия в нуклеотидах крайне важны для биохимии организма. Существуют нуклеотиды, подобные выше перечисленным, но имеющие по две или даже три объединенные фосфатные группы вместо одной. Эти соединения являются ключевыми в обеспечении хранения и высвобождения энергии. Самым известным из них

является аденозинтрифосфорная кислота, обозначаемая сокращением АТФ. Молекула ее похожа на молекулу адениловой кислоты, но, в отличие от нее, в АТФ имеются три фосфатные группы, а не одна. Существуют также нуклеотидоподобные соединения, «кооперирующиеся» в совместных действиях с некоторыми ферментами, называемые коферментами. В них иногда рибозу сменяет глюкоза или другие углеводы, а пурины или пиримидины иные азотсодержащие кольца.

Для формирования нуклеиновой кислоты нуклеотиды собираются в единую цепь посредством фосфатной группы. В отдельных нуклеотидах, как правило, имеется первичный фосфат с одной связью, но вместо него может быть и вторичный фосфат, вторая валентность которого связана вторым нуклеотидом. Таким образом, с помощью вторичных фосфатов можно связать целое множество нуклеотидов - полинуклеотидную цепочку.

Если полинуклеотид состоит из рибозных нуклеотидов, то у каждой сахарной группы в цепочке имеется гидроксильная группа. В тех полинуклеотидах, которые состоят из дезоксирибозных нуклеотидов, такой свободной гидроксильной группы нет. Следовательно, РНК состоит из полинуклеотидной цепочки, у сахарной составляющей которой имеется гидроксильная группа, а ДНК - из полинуклеотидной цепочки, где сахар лишен гидроксильных групп.

На первых этапах исследования нуклеотидных кислот было отмечено неравенство в количестве пуринов и пиримидинов, что приводило к опасению, что никакие закономерности установлены вообще не будут. К примеру, количество адениновых групп, как правило, оказывалось больше, чем количество гуаниновых групп, но соотношение их никогда не было одним и тем же у разных видов живых существ. В нуклеиновых кислотах, полученных из морских

ежей, аденина обнаруживалось в два раза больше, чем гуанина, а в нуклеиновых кислотах человека - только в полтора. А у других видов живых существ, наоборот, гуаниновых групп оказывалось больше, чем адениновых. Однако в дальнейшем были установлены общие закономерности, верные для всех видов живых существ, от человека до вирусов:

1) общее количество аденинов во всех изученных нуклеиновых кислотах всегда оказывалось примерно равным общему количеству тиминов в ДНК или урацилов в РНК;

2) общее количество гуанинов во всех изученных нуклеиновых кислотах всегда оказывалось примерно равным общему количеству цитозинов;

3) общее количество пуринов (аденинов и гуанинов) равно общему количеству пиримидинов (тиминов и цитозинов в ДНК, урацилов и цитозинов в РНК).

Это были уже интересные закономерности, и дальнейшие события показали, что они являлись также важным ключом к структуре нуклеиновой кислоты. Решающий вклад был сделан в 1953 году, когда английский физик М. Уилкинс произвел исследование нуклеиновых кислот с помощью рентгеновского излучения, а сотрудничавшие в Кембриджском университете англичанин Ф. Крик и американец Дж. Уотсон на основе этой работы выдвинули важную теорию о строении нуклеиновой кислоты.

Метод дифракции рентгеновских лучей (с помощью которого впоследствии Джон Кендрю разработает точную модель трехмерной структуры белка), заключается в испускании на вещество пучка рентгеновских лучей. Большая часть лучей проходит сквозь облучаемое вещество напрямую, но некоторая часть, проходя через исследуемый материал, отклоняется от прямой линии. Если атомы вещества, через которое проходят лучи, расположены в случайном

порядке, то и эти отклонения будут случайными. В таком случае, подставив фотографическую пластину под лучи, прошедшие через исследуемое вещество, экспериментатор получает следующую картину - темное пятно в середине, соответствующее попаданию основного пучка лучей, и легкую дымку от отклоненных лучей вокруг основного пятна, постепенно исчезающую по мере удаления от него. Интенсивность этой дымки на определенном расстоянии от центра будет одинаковой в любом направлении.

Если же структура атомов исследуемого вещества упорядочена, то и лучи отклоняются в одних направлениях больше, чем в других. Особенно хорошо это заметно в тех случаях, когда атомы упорядочены строго - например, в кристаллах. Пучок рентгеновских лучей, пропущенный сквозь кристалл, образует на фотопластинке красивый симметричный рисунок из линий, отходящих от центра. По расстояниям до этих линий и по углам, под которыми они расходятся, можно рассчитать относительное расположение атомов в кристалле.

Применять этот метод можно и к макромолекулам, составляющие которых повторяются неким упорядоченным образом. Расположение атомов в них не такое жесткое, как в кристаллах, но и не беспорядочное. Дифракционный рисунок получается более размытым и трудным для интерпретации, но это и не просто равномерно-градиентная дымка.

Уотсон и Крик, обрабатывая данные, полученные в результате дифракции рентгеновских лучей (рисунок 6), пришли к выводу о том, что нуклеиновая кислота имеет форму трехмерной спирали.

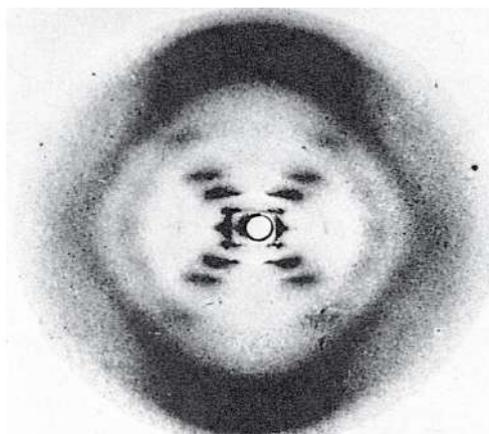


Рисунок 6. Снимок нуклеиновых кислот с помощью рентгеновского излучения, полученный Розалиндой Франклин в 1952 году

По Уотсону-Крику, нуклеиновая кислота состоит из двух полинуклеотидных цепочек, свернутых в две взаимосвязанные трехмерные спирали вокруг одной оси. Спиралевидные линии представлены сахарофосфатной основой, а пурины и пиримидины отходят от этих линий по направлению к центральной оси. Две спиралевидные нити молекулы нуклеиновой кислоты удерживаются воедино с помощью водородных связей между пуринами и пиримидинами в той точке, где они сходятся в центре спирали.

Соответственно, предположили три варианта таких водородных связей: связь между двумя пуринами, связь между двумя пиримидинами и связь между пурином и пиримидином.

Поскольку пурин состоит из двух колец, а пиримидин - из одного, то сочетание «пурин-пурин» означало бы появление длинной цепочки из четырех колец от одной нити основы до второй, сочетание «пиримидин-пиримидин» - короткой цепочки из двух колец, а сочетание «пурин-пиримидин» - «средней» цепочки из трех колец.

Если бы в двойной спирали имели место все три варианта, то для осуществления каждого из них требовались бы разные расстояния между нитями. В модели Уотсона-Крика, построенной на основе данных, полученных в результате дифракции рентгеновских

лучей, такая организация невозможна. По всей протяженности двойной спирали нити разделяет одно и то же расстояние. Соответственно, все связи должны принадлежать к одному из трех типов — либо «пурин-пурин», либо «пиримидин-пиримидин», либо «пурин-пиримидин». Но если бы все связи в молекуле принадлежали исключительно к виду «пурин-пурин», то в ней не оставалось бы места пиримидинам, а если бы исключительно к виду «пиримидин-пиримидин», то делать с пуринами? В связи с этим была исключена вероятность наличия между нитями связей типа «пурин-пурин» и «пиримидин-пиримидин». Единственно допустимым осталось сочетание «пурин-пиримидин». По всей длине спиралевидных нитей спирали пурина одной из них должен был соответствовать пиримидин другой, чтобы в середине молекулы их объединила водородная связь.

Модель двойной спирали, представленная Уотсоном-Криком, немедленно принесла свои плоды. Уотсон и Крик выдвинули идею о том, что при клеточном делении молекулы нуклеиновой кислоты, составляющие гены и хромосомы, реплицируются путем процесса, в котором каждая из двух имеющихся нитей служит моделью для своей пары.

Модель строения и репликации нуклеиновой кислоты, предложенная Уотсоном и Криком, оказалась столь четкой и простой (ученые используют в таких случаях слово «элегантная») и при этом столь много объясняющей, что биохимическая общественность восприняла ее с восторгом. Однако, сколь привлекательной ни была бы теория, необходимо иметь факты, свидетельствующие в ее поддержку.

Так вот, по модели репликации нуклеиновой кислоты, предложенной Уотсоном-Криком, получается, что сами отдельные полинуклеотидные нити ДНК никогда не распадаются. Пара нитей может распадаться, и каждая нить начинает собирать свободные

нуклеотиды, чтобы построить из них себе пару, но сама она все время остается неизменной.

Соответственно, осталось поставить эксперимент, результат которого будет одним в том случае, если нить распадается, и другим - если она остается нетронутой. Такой эксперимент и был проведен в 1958 году. Была выращена линия бактерий в среде, содержащей в большом количестве тяжелый изотоп атома азота (так называемый азот-15, в противоположность обычному азоту-14). Этот изотоп легко обнаруживается современными средствами. Бактерии постепенно внедряли азот-15 в различные синтезируемые ими вещества, и в частности - в новые полинуклеотидные цепочки. После очень долгого периода культивирования этих бактерий уже практически все их полинуклеотидные цепочки содержали азот-15. Обозначим каждую молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую две нити с азотом-15, как «15-15». Далее некоторое количество бактерий с ДНК «15-15» перенесли в среду, содержащую обычный азот-14, и дали прожить там ровно два поколения. Если полинуклеотидные нити расщепляются на мелкие фрагменты, вплоть до отдельных нуклеотидов, а затем объединяются заново, то все полинуклеотидные нити, образованные в течение этих двух поколений, должны содержать азот-15. Разумеется, его содержание будет разбавлено притоком обычных атомов азота-14, так что в каждой из нитей азота-15 будет меньше, но присутствовать он должен в каждой. Нуклеиновые кислоты должны оставаться такими же - «15-15», и никаких различий между ними наблюдаться не должно.

Если же представление Уотсона-Крика верно и нити не распадаются, то при первой репликации нуклеиновые кислоты «15-15» распадутся на две нити «15». Каждая из них построит себе в пару новую нить; однако эти новые нити будут содержать уже не азот-15, а азот-14, так что нуклеиновые кислоты нового поколения будут состоять из одной старой нити и одной новой, то есть все будут

выглядеть как «15-14». При второй репликации две нити новой нуклеиновой кислоты опять разделятся. На этот раз половина из них будет «15», а вторая половина - «14». Так что третье поколение нуклеиновых кислот будет наполовину состоять из кислот «15-14», а наполовину — из «14-14».

Через два поколения нуклеиновые кислоты были подвергнуты внимательному изучению, и действительно обнаружилось, что они делятся на две группы - в молекулах одной имеется азот-15, а в молекулах второй - нет. Такие же результаты были получены и в экспериментах, проведенных в Национальной лаборатории в Брукхевене, только там в качестве подопытных материалов использовались клетки растений и радиоактивный водород. В итоге опять же одни хромосомы оказались радиоактивными, другие - нет. Одним из следствий репликационной модели Уотсона-Крика является то, что в течение всей жизни организма полинуклеотидная нить не подвергается никаким изменениям.

Когда теории Уотсона-Крика еще не существовало, значение РНК никак нельзя было назвать недооцененным. Конечно, уже было известно, что это не основная составляющая хромосом, но очевидная связь между РНК и синтезом белков заставляла даже переоценивать ее значение в глазах биохимиков.

Концентрация ДНК в различных клетках отдельного организма казалась величиной постоянной. Каждая клетка, растущая или нет, имеет одно и то же содержание ДНК. Единственным исключением являются половые клетки - яйцеклетки и сперматозоиды. В них имеется только по одной хромосоме из каждой пары, то есть - половина набора, так что и ДНК в них содержится вдвое меньше, чем в соматических клетках.

Что же касается РНК, то ее концентрация в различных клетках одного и того же организма может быть совершенно разной.

Эксперименты начала 1940-х годов неизменно показывали, что концентрация РНК выше там, где интенсивнее ведется синтез белков. Растущие клетки более насыщены РНК, чем прекратившие рост, - ведь растущей клетке требуется удвоить свое белковое содержание за срок от возникновения до готовности к новому делению. Если часть ткани растет, а часть - нет, то концентрация РНК выше в растущей половине.

Богаты РНК и ткани, в которых происходит секреция веществ с повышенным белковым содержанием, - например, печень и поджелудочная железа. Более того, если в окружение клетки добавить ферменты, приводящие к расщеплению РНК (но не влияющие на ДНК), так, что молекулы РНК распадаются, от этого останавливается и производство белков.

В целом становилось ясно, что РНК имеет самое непосредственное отношение к синтезу белков. Важность синтеза белков для процесса жизнедеятельности столь велика, что вначале 1950-х не могло не возникнуть общепринятого воззрения, что именно РНК является наиболее фундаментальной и жизненно важной разновидностью нуклеиновой кислоты.

Однако эти РНК-приоритетные взгляды продержались недолго. Весь накопленный опыт свелся, наконец, к тому, что ДНК первична, а РНК - вторична по отношению к ней. Поскольку белок находится главным образом в цитоплазме, то и РНК стали искать именно там - и действительно обнаружили. На самом деле в цитоплазме находится большая часть РНК клетки, а ДНК там нет вообще. Это значит, что РНК должна каким-то образом переходить из ядра клетки в цитоплазму после формирования. Под электронным микроскопом удалось сфотографировать, как некое вещество начинает в виде пузырьков выпирать из ядра и выталкивается из него в цитоплазму. Выяснилось, что эти пузырьки действительно содержат РНК, а в

дальнейшем установлено, что РНК считывает генетический код с ДНК и передает его в цитоплазму, где и управляет формированием белков на основе полученных от ДНК данных.

Все дальнейшее развитие науки было направлено на анализ последовательности ДНК. Встал вопрос, как эту информацию можно прочитать, как понять и использовать на практике. В рамках этого направления были сделаны фундаментальные открытия, которые существенно изменили традиционные представления о структуре генов, их организации в геноме и взаимоотношениях ген - белок, ген - признак и генотип-фенотип. В результате произошло усовершенствование техники генетического анализа, увеличение его разрешающей способности и принципиальные изменения методологии современной генетики.

Ген стал основным объектом исследования и изменения его структуры выявляются не по фенотипическому проявлению, а путем непосредственного анализа первичной структуры ДНК. Однако понятие гена в классическом смысле этого слова остается неизменным, определяется как фрагмент ДНК, в последовательности нуклеотидов которой закодирована информация о последовательности нуклеотидов в другой нуклеиновой кислоте, или аминокислотной последовательности в белке.

1.2. СЕКВЕНИРОВАНИЕ ГЕНОМОВ ВЫСШИХ ОРГАНИЗМОВ

Стремительное развитие молекулярной генетики в последние десятилетия, связанное, в первую очередь, с технологическим прорывом в области секвенирования геномов высших организмов, позволило уже сейчас применять на практике молекулярно-генетическую информацию при работе с биологическими объектами. В 2004 году был завершен крупномасштабный проект «Геном человека», связанный с расшифровкой полной нуклеотидной

последовательности ДНК человека. Проект «Геном человека» являлся наиболее амбициозной биологической исследовательской программой за всю историю науки. Исследования человеческого генома так же необходимо человечеству, как когда-то было необходимо знание человеческой анатомии. Осознание этого пришло в 1980-х, и это привело к тому, что появился проект «Геном человека».

Целями проекта являлись:

- идентификация 20 000–25 000 генов ДНК;
- определение последовательности 3 млрд. пар химических оснований, составляющих ДНК человека, и сохранение этой информации в базе данных;
- усовершенствование приборов для анализа данных;
- внедрение новейших технологий в область частного использования;
- исследование этических, правовых и социальных вопросов, возникающих при расшифровке генома.

Исходная идея проекта зародилась в 1984 среди группы физиков, работавших в Министерстве энергетики США и желавших заняться другой задачей после завершения работ в рамках ядерных проектов. В 1988 Объединенный комитет, куда входили Министерство энергетики США и Национальные институты здоровья, представили обширный проект, в задачи которого – помимо секвенирования генома человека – входило всестороннее изучение генетики бактерий, дрожжей, нематоды, плодовой мушки и мыши (эти организмы широко использовались в качестве модельных систем в изучении генетики человека). Кроме того, предусматривался детальный анализ этических и социальных проблем, возникающих в связи с работой над проектом. Комитету удалось убедить Конгресс выделить на проект 3 млрд. долларов (один нуклеотид ДНК – за один доллар), в чем немалую роль сыграл ставший во главе проекта Нобелевский лауреат

Дж. Уотсон. Вскоре к проекту присоединились другие страны (Англия, Франция, Япония и др.). В России в 1988 с идеей секвенирования генома человека выступил академик А.А. Баев, и в 1989 в нашей стране был организован научный совет по программе «Геном человека»

В 1990 была создана Международная организация по изучению генома человека (HUGO), вице-президентом которой в течение нескольких лет был академик А.Д. Мирзабеков. С самого начала работ по геномному проекту ученые договорились об открытости и доступности всей получаемой информации для его участников независимо от их вклада и государственной принадлежности. Все 23 хромосомы человека были поделены между странами-участницами. Российские ученые должны были исследовать структуру 3-й и 19-й хромосом. Вскоре финансирование этих работ в нашей стране было урезано, и реального участия в секвенировании Россия не принимала. Программа геномных исследований в нашей стране была полностью перестроена и сконцентрирована на новой области – биоинформатике, которая пытается с помощью математических методов понять и осмыслить все, что уже расшифровано. Закончить работу предполагалось через 15 лет, т.е. примерно к 2005. Однако скорость секвенирования с каждым годом возрастала, и если в первые годы она составляла несколько миллионов нуклеотидных пар за год по всему миру, то на исходе 1999 частная американская фирма «Celera», возглавляемая Дж. Вентером, расшифровывала не менее 10 млн. нуклеотидных пар в сутки. Этого удалось достичь благодаря тому, что секвенирование осуществляли 250 роботизированных установок; они работали круглосуточно, функционировали в автоматическом режиме и сразу же передавали всю информацию непосредственно в банки данных, где она систематизировалась, аннотировалась и становилась доступной ученым всего мира. Кроме

того, фирма «Celera» широко использовала данные, полученные в рамках Проекта другими его участниками, а также разного рода предварительные данные. 6 апреля 2000 состоялось заседание Комитета по науке Конгресса США, на котором Вентер заявил, что его компания завершила расшифровку нуклеотидной последовательности всех существенных фрагментов генома человека и что предварительная работа по составлению нуклеотидной последовательности всех генов (предполагалось, что их 80 тыс. и что они содержат примерно 3 млрд. нуклеотидов), наконец, завершена. Доклад был сделан в присутствии представителя HUGO, крупнейшего специалиста по секвенированию д-ра Р.Уотерсона. Расшифрованный фирмой «Celera» геном принадлежал анонимному мужчине, т.е. содержал как X-, так и Y-хромосомы, а HUGO использовали в своих исследованиях материал, полученный от разных людей (были использованы кусочки генокода множества людей, а затем собраны в единое целое, среди них генокоды К. Вентера, Дж. Уотсона, д-ра Ст. Куэйка, двух корейцев, китайца, африканца, а также больного лейкемией, национальность которого ныне уже трудно установить). Между Вентером и HUGO велись переговоры о совместной публикации результатов, однако они закончились безрезультатно из-за разногласий по поводу того, что считать завершением расшифровки генома. По мнению компании «Celera», об этом можно говорить лишь в том случае, если гены полностью секвенированы и известно, как расшифрованные сегменты располагаются в молекуле ДНК. Этому требованию удовлетворяли результаты «Celera», в то время как результаты HUGO не позволяли однозначно определить взаимное положение расшифрованных участков. В результате в феврале 2001 в специальных выпусках двух авторитетнейших научных журналов, «Science» и «Nature», были отдельно опубликованы результаты исследований «Celera» и HUGO и

приведены полные нуклеотидные последовательности генома человека, охватывающие около 90% его длины. Однако это был лишь черновик человеческого генома и лишь к 2004 году работы по расшифровке генома человека были завершены.

В результате исполнения проекта «Геном человека» был создан открытый банк генокода. Общедоступность полученной информации позволила многим исследователям ускорить свою работу. Ф. Коллинз привел в качестве иллюстрации такой пример: «Поиск гена фиброзно-кистозной дегенерации был успешно завершён в 1989 г., что стало результатом нескольких лет исследований моей лаборатории и ещё нескольких других и стоило США около 50 млн долл. Сейчас это способен сделать смысленый выпускник университета за несколько дней, и все, что ему понадобится, - это Интернет, несколько недорогих реактивов, термоциклический аппарат для увеличения специфичности сегментов ДНК и доступ к ДНК-секвенатору, читающему ее по световым сигналам».

В процессе реализации проекта «Геном человека» происходило развитие технологии секвенирования, что позволила в дальнейшем реализовать очередной проект по изучению ДНК человека. В январе 2008 года был запущен масштабный проект «1000 геномов» («1000 Genomes Project»), изначальной целью которого было полное секвенирование геномов тысячи человек - представителей разных рас и национальностей. В работе приняли участие команды исследователей из США, Великобритании, Италии, Перу, Кении, Нигерии, Китая и Японии. Это была не простая задача, так как геном человека содержит около 3 млрд. пар нуклеотидов (из них 20-25 тыс. генов). Тем не менее, в ходе работы ученым к 2015 году удалось расшифровать геномы 2504 человек, представляющих 26 разных популяций.

Исследования генома человека «потянули» за собой секвенирование геномов огромного числа других организмов, в том числе и сельскохозяйственных животных. Корова герефордской породы по кличке Доминетт (Dominette) стала первой коровой, геном которой был расшифрован на 90 процентов в 2009 году. В рамках проекта, который продолжался более шести лет, 300 исследователей занимались секвенированием генома. Результаты показали, что геном коровы содержит около трех миллиардов нуклеотидов (примерно столько же, сколько у человека), которые составляют 22 тысячи генов.

В процессе изучения генома ученым удалось обнаружить большое количество генов, отвечающих за работу иммунной системы. По словам исследователей, это может быть связано с тем, что в желудке коровы обитает большое количество микроорганизмов, которые помогают коровам переваривать растительную пищу, однако могут представлять потенциальную инфекционную опасность.

Другая группа исследователей (частично пересекающаяся с предыдущей), занималась изучением отдельных SNP (однонуклеотидных полиморфизмов, Single nucleotide polymorphism) в ДНК 500 коров, которые принадлежали к 19 различным породам. Всего ученые рассмотрели около 37 тысяч полиморфизмов, которые связаны с качеством молока и мяса. Биологи считают, что новые результаты помогут селекционерам в выведении коров с заранее известными характеристиками.

В рамках исследования удалось установить, что популяция отдельных пород, несмотря на большой период проведения селекции (которое приводит к уменьшению разнообразия, поскольку нацелено на закрепление тех или иных особенностей особей) остается достаточно разнообразной. В частности, коровы генетически разнообразнее других домашних животных - собак. По словам ученых, это может являться результатом того факта, что домашние коровы на

территории Европы регулярно смешивались со своими дикими собратьями (Туры), которые обитали в этой части света до конца XVII века.

В 2009 г. группа ученых из разных стран получила первый черновой вариант генома домашней свиньи. В качестве поставщика материала выступила свинья породы дюрок, одной из пяти основных пород, используемых для производства свинины во всём мире. Исследование, на которое ушло около \$24,5 миллиона, проводили всем миром, однако информация собиралась в британском институте Сенгера. В результате была получена карта 98% генома. В 2012 году Международный консорциум учёных сообщил об очередном достижении в расшифровке генетического кода животных. На этот раз был полностью секвенирован геном домашней свиньи (*Sus scrofa domestica*) и её близкого родственника дикого кабана (*Sus scrofa*). Первые подробности нового исследования были представлены в журнале Nature. Очень важно, что эту информацию сделали общедоступной, так как это поможет не только повысить эффективность выращивания животных и улучшить качество мяса, но и будет способствовать использованию свиней в качестве модели для биомедицинских исследований болезней человека.

В результате данного проекта было установлено, что ДНК свиньи состоит из 2,6 миллиарда нуклеотидных пар и содержит в себе почти 22 тысячи генов. Исследователи сравнили отдельные участки генетического кода свиней с геномами человека, мыши, собаки, лошади и коровы. Это позволило обнаружить новые детали эволюции свиней и раскрыть интересные особенности их физиологии. Проведя сравнение генетического кода десяти разновидностей диких кабанов из разных регионов Европы и Азии, исследователи также восстановили картину миграции их давних предков по территории

Евразии. Оказалось, что европейские и азиатские линии разделились почти миллион лет назад.

"Эти ветви разошлись так давно, что сейчас можно говорить о них, как о подвидах, — сообщает Лоуренс Шук из университета Иллинойса. — Мы нашли такое же различие между восточными и западными породами домашних свиней. Это ясно свидетельствует о том, что свиньи были независимо одомашнены в западной Евразии и Восточной Азии".

Учёные выяснили, что некоторые группы генов домашних свиней претерпевали довольно быстрые эволюционные изменения. Особенно это касается генов, отвечающих за иммунитет и обоняние. Например, у свиней обнаружено 39 генов, кодирующих белок интерферон, который противостоит вирусам. Это в два раза больше, чем у человека.

Интересно, что при хорошо развитом обонянии свиньи плохо чувствуют вкус. Так, у них очень мало генов, отвечающих за рецепторы горького вкуса. Существенные различия выявлены также в рецепторах, различающих сладкую и солёную пищу.

Благодаря потрясающему сходству в анатомии отдельных органов и тканей свиней и человека, свиньи стали основным объектом для изучения болезней человека. В этом отношении полученные в ходе секвенирования ДНК данные являются настоящим кладом для подобных работ, так как было идентифицировано большое количество генов, связанных с болезнями людей (ожирение, диабет, болезни Паркинсона и Альцгеймера).

Международная команда ученых, включая Центр секвенирования генома человека в Медицинском колледже Бейлора, в 2014 году завершила секвенирование генома овец, получив новую информацию об уникальных и специализированных пищеварительных и метаболических системах этого вида. Также на основании полученных

генетических данных было установлено, что козы и овцы, как самостоятельные виды, разделились около четырех миллионов лет назад. В этом исследовании исследователи собрали опорный геном у двух представителей овец породы текстиль.

Овцы - это жвачные животные со сложным 4-камерным желудком. Рубец – это самый большой отдел желудка, который, как считается, развился около 35-40 миллионов лет назад и обладает способностью превращать лигноцеллюлозные богатые растительные материалы в животных белка. Шерсть является наиболее главным селекционо-значимым признаком овец, в то время как синтез шерсти должен быть связан с метаболизмом жирных кислот. Данные генома, полученные в этом исследовании, будут способствовать лучшему пониманию всех этих необычных характеристик эволюции овец. Ген-кодирующие белки, участвующие в развитии кератинизированной эпидермальной структуры, имеют отношение к образованию рубца, кожи и шерсти.

Согласно этому исследованию, ученые обнаружили не аннотированный ген и предположили, что он специфичен для млекопитающих и связан с синтезом кератина в рубце. Кроме того, обнаружили ранее не изученный ген, который, предполагают, связан с образованием шерсти.

1.3. ДНК МАРКЕРЫ И МАРКЕР-ЗАВИСИМАЯ СЕЛЕКЦИЯ С.-Х. ЖИВОТНЫХ

На сегодняшний день для большинства важнейших сельскохозяйственных видов созданы подробные генетические карты, на которые нанесены сотни молекулярно-генетических маркеров. Многие из этих данных находятся в свободном, публичном доступе, еще больше данных по генетическим маркерам можно получить на специально оговоренных условиях и для коммерческого

использования. Этот последний факт свидетельствует сам за себя: генетические маркеры начинают все шире использовать в практике и, в первую очередь, с целью применения их как нового и многообещающего инструмента в селекционных программах. Для такого нового подхода в селекции в англоязычной научной литературе был выработан специальный термин - Marker assisted selection (MAS), который впервые был принят в литературе в 1986 году. Согласно «Словарю терминов по биотехнологии для производства продовольствия и ведения сельского хозяйства» Продовольственной и сельскохозяйственной Организации Объединенных Наций (The Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO), MAS - это «маркерная селекция - использование ДНК-маркеров для повышения эффективности селекционной работы, которое базируется на выявлении маркеров селекционных признаков».

Принцип маркер-зависимой селекции, состоит в том, что если известна локализация гена, который влияет на проявление хозяйственно важного признака, то по этому признаку следят не за его собственным проявлением, а по наследованию гена, который его контролирует. Такой отбор особенно эффективен при работе с признаками, контролируемые генами с не полной пенетрантностью, а также с количественными признаками, контролируемые группами генов с достаточно выраженным влиянием каждого гена группы на проявление признака. Данный подход широко используется в селекционных программах экономически развитых стран в качестве методического приема для интенсификации селекционных процессов.

Необходимым условием любой программы MAS является наличие молекулярных маркеров. Таким маркером может выступать любой фрагмент ДНК, который используется для обнаружения полиморфизма и находится в тесной генетической связи с геном, который отвечает за рассматриваемый признак. Для живых

организмов характерно сцепленное наследование, при котором фрагменты ДНК, локализованные на одной хромосоме в непосредственной близости друг от друга, наследуются вместе. Благодаря этому маркер может использоваться для уточнения механизмов наследования гена, который еще не был точно локализован.

Использование определенных участков ДНК, для которых установлен полиморфизм, в качестве генетических маркеров получило широкое распространение в восьмидесятых годах XX века для решения таких задач, как, сохранение генофондов пород сельскохозяйственных животных, идентификация родственных связей, происхождения пород и отдельных особей, повышение эффективности селекции по отдельным признакам и др. В Европе генетические маркеры стали активно использовать в селекции свиней в начале 1990 г. с целью освобождения популяций от гена, который вызывает синдром стресса у свиней.

Фундаментальная основа селекции животных - отбор конкретных особей с желательными признаками. Масштабы и сложность отбора, количество и размер популяций в традиционных селекционных программах требуют новых инструментов, к которым с уверенностью можно отнести MAS. Отбор по молекулярным маркерам имеет огромный потенциал для повышения эффективности и точности традиционной селекции животных.

Развитие молекулярно-биологических исследований привело к появлению нового типа генетических маркеров – ДНК маркеров. Первыми молекулярными маркерами были биохимические маркеры, основанные на белковом полиморфизме, а еще ранее – классические генетические маркеры. В животноводстве сегодня все большую популярность приобретают ДНК-маркеры селекционных признаков,

которые используют для проведения отбора и подбора животных по генотипу.

Теоретическое обоснование использованию генетических маркеров («сигналей») впервые дал А.С. Серебровский: «... сигналами мы называем удобные для менделистических наблюдений альтернативные гены с более или менее известной локализацией, которые, не оказывая воздействия на изучаемый трансгрессирующий признак и влияя достаточно определенным образом, облегчают генетический анализ этого признака, позволяя следить за наследованием того участка хромосомы, в котором эти сигналы расположены».

В настоящее время насчитывается несколько десятков типов молекулярных маркеров. Микросателлиты - это повторяющиеся участки ДНК длиной в 2 – 6 п.н. При этом для различных аллелей характерно различное число повторов. Микросателлиты были первыми высокополиморфными маркерами для индивидуальных локусов. Эти маркеры имеют несколько названий: микросателлиты, STMS (Sequence Tagged Microsatellite Site), STR (short tandem repeat), SSR (simple sequence repeat). На сегодняшний день считается, что в основе полиморфизма микросателлитов лежат ошибки (эффект «проскальзывания») в процессе репликации или репарации ДНК. За счет высокого уровня полиморфизма, равномерного распределения в эухроматиновой части геномов и относительно широкой представленности, микросателлиты имеют достаточную популярность. Несмотря на это, недостатки, связанные с неравномерной скоростью мутирования разных микросателлитов и некоторыми техническими проблемами, создают сложности для популяционно-генетического анализа. Кроме того, при создании маркеров для локусов количественных признаков микросателлитов бывает недостаточно. Микросателлиты применяют для определения

степени гетерозиготности небольших популяций, пород, консолидированности линий и групп, оценки достоверности происхождения сельскохозяйственных животных. Благодаря высокой степени полиморфизма микросателлитные маркеры используют также и при оценке генетических расстояний между популяциями домашних животных и их диких предков.

Многие ученые отмечают, что при создании маркеров для локусов количественных признаков микросателлитов, как правило, бывает недостаточно. Для того, чтобы более оценить генетический потенциал по селекционно-значимым признакам сельскохозяйственных животных проводятся исследования по выявлению информативных однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) и разработке систем ДНК-анализа генов, влияющих на проявление признаков

Согласно общепринятому определению, SNP — это однонуклеотидные позиции в ядерной ДНК, для которых в популяции могут встречаться различные варианты последовательностей (аллели) с частотой редкого аллеля не менее 1%. Причиной этих замен могут служить спонтанные мутации и влияние мутагенов. Отличие последовательностей даже по одной паре нуклеотидов может вызвать различное проявление признака. Для SNP характерна высокая частота встречаемости в геноме (например, у человека соотношение между количеством SNP и числом пар нуклеотидов составляет примерно одна замена на 1000 п.н., соответственно). SNP характеризуются малым числом мутаций из расчета на одно поколение. Это выгодно отличает SNP от микросателлитов с точки зрения удобства для популяционно-генетического анализа. Также для SNP разработаны автоматические методы идентификации.

В последнее время иностранные компании стремятся объединить свои усилия по систематизации данных полученных в

результате применения на практике ДНК-маркеров, создавая единую базу данных, тем самым обеспечивая к ней широкий доступ для постоянного пополнения информацией о результатах тестирования большого количества животных по известным SNP.

Геном сельскохозяйственных животных имеет миллионы точечных мутаций. Никакой другой тип геномных различий не способен обеспечить такую плотность маркеров. С помощью ДНК-маркеров можно оценить частоту предпочтительных аллелей для породы или линии, и с учетом этого проводить селекцию животных с целью увеличения концентрации желательного аллеля в изучаемой популяции.

ДНК маркеры имеют ряд преимуществ, которые делают их важным инструментом селекции:

1. Позволяют однозначно отличить гомозиготный генотип от гетерозиготного.

2. Не подвержены влиянию условий среды и имеют коэффициент наследуемости $h^2 = 1,0$.

3. Как правило, определяются независимо от возраста (в клетках эмбриона, в образцах крови, ткани животного и т.д.).

4. Могут быть определены у обоих полов (например, маркер генотипа, определяющего число поросят в гнезде, относится как к маткам, так и к хрякам).

5. Маркирование признака, который может быть определен после убоя.

Маркерные гены особенно актуальны для оценки признаков, фенотипическое проявление которых происходит относительно поздно, ограничено полом или на проявление которых большое влияние оказывают факторы окружающей среды. Такими признаками являются: резистентность или предрасположенность к болезням, плодовитость, молочная и мясная продуктивности и т.д. По числу

генов, влияющих на проявление признака, все признаки можно подразделить на две категории:

1. Моногенные или олигогенные признаки (главные гены). Для таких признаков, в случае приблизительной локализации гена, существует возможность идентификации ДНК-маркеров, расположенных внутри главного гена или в непосредственной близости от него.

2. Полигенные признаки (локусы количественных признаков, QTL). К признакам с полигенной природой наследования относятся большинство важных хозяйственно полезных признаков сельскохозяйственных животных. Полигенная природа признака означает, что его количественный уровень генетически определяется различными аллельными вариантами целого ряда локусов, разбросанных по всему геному.

Определенная часть генов может кодировать продукт, участвующий в ряде ключевых процессов, и, следовательно, оказывать более сильное влияние на формирование признака. Это так называемые «мажорные» гены. В качестве «мажорных» условно принято считать те гены, у которых различие по величине признака между альтернативными гомозиготами равно стандартному отклонению или превышает его.

Селекция на улучшение интересующего признака, базируется изначально на выборе генов, детерминирующих биохимические процессы, связанные с формированием признака. Затем исследуется полиморфизм этих генов и продуктивные особенности животных, несущих в своем генотипе разные аллели этого гена. Следовательно, гены-кандидаты – это гены, кодирующие ключевые белки, принимающие участие в формировании признака. Особенностью таких генов является то, что изначально неизвестно наличие аллельных вариантов гена и их влияние на величину признака.

Различают позиционные и функциональные гены-кандидаты. О позиционных генах-кандидатах говорят в том случае, если данные гены расположены в области, прилегающей к точке локализации локусов количественных признаков. Функциональные гены кандидаты – это гены, продукты которых играют ключевую роль в формировании данного признака. Значение генетических вариантов таких генов необходимо исследовать во взаимосвязи с изменением признака. Методом анализа позиционных генов-кандидатов был открыт «ген мышечной гипертрофии» миостатин, являющийся причиной синдрома двойного бедра у крупного рогатого скота бельгийской голубой породы и пьемонтского скота. Аналогичный подход был использован для открытия так называемого «гена вареного окорока» свиней породы гемпшир, связанный с мясной продуктивностью и качеством мяса.

Существуют различные механизмы влияния аллельных генов на признаки. В то же время, по мнению многих авторов, маркерная селекция оказывается эффективной даже при отсутствии некоторых из них (например, плейотропии и сцепления). В любом случае, даже временные связи маркерных генов с хозяйственно полезными признаками могут быть использованы в племенной работе с конкретными популяциями животных и получен экономический эффект. ДНК маркеры селекционных признаков – это молекулярно-генетические маркеры, тесно сцепленные с целевыми генами, являются инструментами для предсказания фенотипического проявления хозяйственно-ценных признаков с.-х. животных. Целевые гены (гены-маркеры) представлены генами, белковый продукт которых играет значительную роль в формировании и регуляции физиологических процессов. Сам ген при этом должен обладать полиморфизмом (различными аллельными вариантами), связанным с вариативностью уровня продуктивности. «Считывание» этих

вариантов и выявление желательных позволяет проводить селекцию животных по генотипам.

На сегодняшний день определено множество целевых генов с.-х. животных, связанных с различными признаками продуктивности. Некоторые из них получили широкое распространение в практической селекции, другие находятся в стадии исследования и апробации.

Диагностика аллельных вариантов целевых генов основана на определении различий нуклеотидных последовательностей в определенных локусах этих генов. Как правило, длина этих локусов составляет от 100 до 2000 п.н., расположенных как в экзонах (кодирующей части гена), так и в интронах (некодирующей части гена). Нуклеотидные последовательности в локусе могут различаться по длине, за счет наличия инсерций или делеций, либо по одному нуклеотиду (точковая мутация). Основным методом «считывания» этих вариантов является полимеразная цепная реакция (ПЦР) с последующей визуализацией фрагментов методом электрофореза. В случае различий по одному нуклеотиду, после ПЦР необходимо дополнительно провести рестрикцию амплифицированных фрагментов. Этот метод получил название ПЦР-ПДРФ (полимеразная цепная реакция - полиморфизм длин рестрикционных фрагментов).

2. СОЗДАНИЕ БИОКОЛЛЕКЦИИ ПЛЕМЕННЫХ РЕСУРСОВ С.-Х. ЖИВОТНЫХ

Геномная регистрация живых организмов приобретает все большую актуальность. Активно идет разработка методов генотипирования растений и животных, попытки создания генетических паспортов для различных биологических объектов ценных как с экологической, так и с сельскохозяйственной точки зрения. Масштабность и важность данной тенденции иллюстрируется также тем, что во многих странах уже введены законы, протоколирующие и регулирующие этот процесс.

Ценность молекулярно-генетической диагностики состоит в том, что она позволяет достоверно определить таксономическую принадлежность организмов вплоть до уровня популяции; оценить уровень полиморфизма и его изменение. В случае паспортизации сельскохозяйственных видов животных оно также дает возможность точно идентифицировать вид, породу, а также, при наличии базы данных, и географическую принадлежность животных.

Современное законодательство, разрабатываемое в Российской Федерации, по примеру Европейского Союза (ЕС) будет требовать идентификации и учета всех сельскохозяйственных животных (в том числе электронной). Одним из направлений по идентификации с.-х. животных является разработка и внедрение методов геномной паспортизации (комплексная программа развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 года). Сельскохозяйственные животные должны будут сопровождаться генетическим паспортом, что составит фундаментальную часть системы, позволяющей управлять различными коммерческими потоками и ветеринарными аспектами животноводства.

Данная процедура учета с.-х. животных позволит проводить идентификацию пищевой (или любой другой) продукции и сырья животного происхождения. Для реализации данного проекта необходимы большие массивы данных, экспериментального материала, биологических образцов, которые могут быть доступны в любой момент, с этой целью каждый исследовательский центр или лаборатория стремится создавать свою уникальную коллекцию биологических образцов.

Наличие большого числа экспериментального материала (образцов ДНК, базы данных продуктивных качеств т.д.) является необходимым условием при разработке молекулярно-генетических и математических методов оценки племенной ценности с.-х. животных. В связи с этим, в лаборатории молекулярной диагностики и биотехнологии с.-х. животных Донского государственного аграрного университета постоянно пополняется биокolleкция племенных ресурсов с.-х. животных. Создана информационная база данных и осуществлен сбор образцов по племенным хозяйствам РФ.

Современные исследования в области животноводства, в частности изучение генетических основ селекционно ценных признаков, требуют комплексного анализа большого массива информации по собственной продуктивности животных и молекулярно-генетических данных, характеризующих индивидуальные особенности каждого животного. Коллекции биологического материала, или био-банки, играют центральную роль в объединении этих двух потоков информации и консолидируют большой объем биологических образцов и сопроводительной информации. Биобанки сегодня — новое направление, которое развивается как самостоятельная область исследования со многими специфическими компонентами, требующая специализированного персонала.

Согласно публикациям за последние годы, в развитии биобанков можно выделить стремление к их интеграции, что позволяет проводить исследования с участием многих научно-исследовательских центров из разных стран. Появление новых биотехнологий и развитие современных концепций изучения продуктивности сельскохозяйственных животных, разработки тест-систем диагностики, проведения таргетного и полногеномного секвенирования ужесточили требования к высококачественным, хорошо аннотированным биологическим образцам для молекулярно-генетических исследований. В настоящее время описаны и утверждены стандарты в отношении забора и хранения биологических образцов.

Сегодня биологические данные и коллекции биологического материала собирают во всех уголках мира. Базы данных — необходимый элемент организации структуры и эффективного функционирования биобанков.

В целях проведения научно-исследовательской работы, теоретических и экспериментальных исследований в области молекулярной селекции и генетики с.-х. животных с последующим внедрением их в производство в Донском государственном аграрном университете в 2013 году была создана лаборатория молекулярной диагностики и биотехнологии с.-х. животных и, на сегодняшний день, технологии генной селекции разрабатываются для всех основных видов сельскохозяйственных животных и внедряются в животноводческие комплексы РФ. В 2015 году лабораторией получено свидетельство МСХ РФ №006701 Серия ПЖ-77 на осуществление молекулярно-генетической экспертизы и проведение в племенных хозяйствах оценки достоверности происхождения. Согласно приказу Минсельхоза РФ от 19.10.2006 N 402 (ред. от 02.08.2010) все племенные заводы, репродукторы и генофондные хозяйства обязаны

проходить генетическую экспертизу для подтверждения происхождения животных. Проводимые в течение ряда лет исследования показали, что наиболее эффективным методом оценки в этой связи являются ДНК-маркеры (уникальные нуклеотидные последовательности). По отношению к традиционным методам (анализ групп крови и иммунологический анализ) они имеют ряд преимуществ: точность, высокую чувствительность, независимость от возраста и пола, простоту получения образцов для исследования, высокую достоверность и хорошую воспроизводимость.

В настоящее время для исследования генофонда различных пород и популяций, установления их генетической структуры и оценки сходства, контроля происхождения и чистопородности племенного материала лабораторией разрабатываются методы и тест-системы, позволяющие с высокой точностью проводить генетическую дифференциацию пород, типов и линий животных.

Одним из необходимых условий всех упомянутых выше исследований является работа с большим массивом качественного биологического материала. С этой целью в лаборатории создается био-коллекция основных видов и пород сельскохозяйственных животных. Сбор образцов, создания базы данных, описывающей фенотипические и молекулярно-генетические характеристики, позволит создать уникальную коллекцию племенных ресурсов для создания конкурентоспособных отечественных технологий молекулярной селекции в животноводстве.

В лаборатории постоянно пополняется биокolleкция племенных ресурсов с.-х. животных. В дальнейшем это послужит ценным материалом:

- при разработке селекционных программ для совершенствования и создания пород и внутривидовых типов и

линий с целью повышения количества и качества животноводческой продукции;

- при разработке методов геномной селекции сельскохозяйственных животных;

- при разработке методов геномной паспортизации сельскохозяйственных животных;

- развитию племенной базы животноводства и планирования стратегий с целью повышения продовольственной безопасности страны.

Наличие биокolleкции позволяет соединить в единую базу все хозяйства Ростовской области и других регионов и систематизировать все данные по сельскохозяйственным животным. Это позволяет проводить анализ достоверности происхождения по имеющимся в коллекции образцам. При анализе потомства уже не будет необходимости в дополнительном анализе родителей, так как все данные по этим животным уже будут в базе. Наличие всей необходимой информации по животным позволит проводить эффективную селекционно-племенную работу, своевременно выявлять генетические аномалии в рецессивном состоянии и проводить раннюю диагностику продуктивных качеств по ДНК-маркерам.

Для учета и анализа полученных результатов разработан ряд компьютерных программ для сопровождения методов маркерной селекции.

Создание информационной базы данных и сбор образцов для биокolleкции по племенным хозяйствам РФ позволит приступить к крупномасштабным исследованиям молекулярно-генетической структуры с.-х. животных.

2.1. Коллекция биологического материала лаборатории молекулярной диагностики и биотехнологии с/х животных

В лаборатории имеется коллекция биологического материала с.-х. животных, которая собирается с 2012 года. В настоящий момент она состоит из 4 000 образцов (2,5 тыс. - свиньи, 0,5 тыс. - овцы, 1 тыс. крупный рогатый скот).

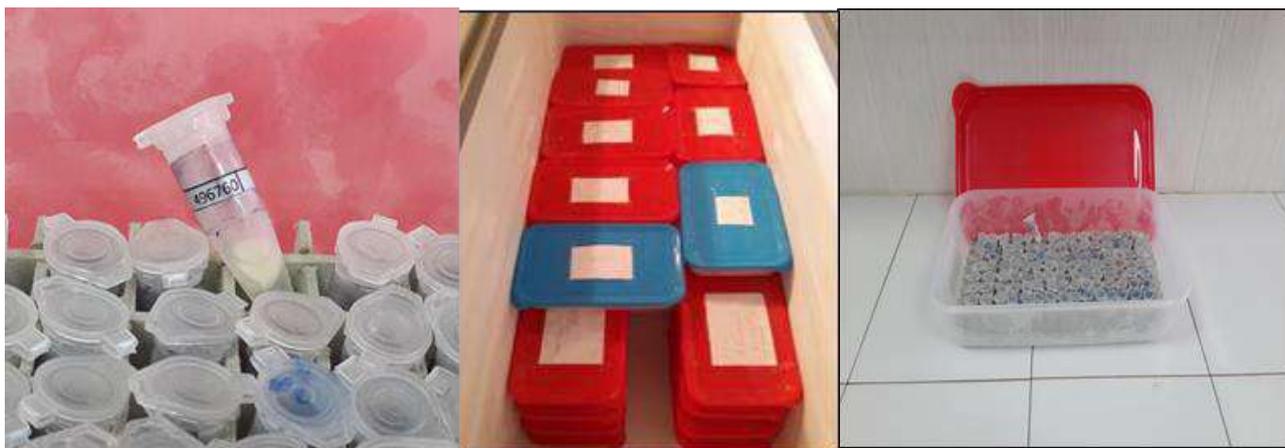


Рисунок 6. Организация хранения различных биологических образцов в морозильных камерах

Для удобства образцы хранятся в специально изготовленных боксах, один вмещает 105 пробирок с биологическим материалом. Каждой ячейке и боксу присваивается индивидуальный номер. Номера пробирок находящиеся в ячейках дублируются в документ, размещаются в базе данных.

Данный способ хранения позволяет быстро находить нужные образцы и держать биологическую коллекцию в порядке.

3. ТЕХНОЛОГИЯ ДИАГНОСТИКИ АЛЛЕЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ ЦЕЛЕВЫХ ГЕНОВ С.-Х. ЖИВОТНЫХ МЕТОДОМ ПЦР И ПЦР-ПДРФ

Технология диагностика аллельных вариантов целевых генов с.-х. животных методом ПЦР-ПДРФ состоит из следующих стадий:

- сбор и подготовка исследуемых образцов (биологического материала);
- подготовка матрицы, которая включает выделение и очистку ДНК;
- амплификация фрагментов целевых генов (ПЦР);
- рестрикция амплифицированных фрагментов (ПДРФ);
- детекция продуктов амплификации с помощью аналитического гель-электрофореза или иных инструментальных методов разделения и детекции нуклеиновых кислот.

3.1. Сбор и подготовка исследуемых образцов

Предоставленные для анализа образцы должны быть запротоколированы по списку в порядке поступления с указанием следующих характеристик:

- вид;
- порода;
- пол;
- название и адрес хозяйства, из которого поступили образцы;
- дата поступления образцов в лабораторию.

В лабораторию могут поступать образцы из различного биологического материала (цельная кровь, выщипы ткани и др.). Цельную кровь для выделения ДНК отбирают из ярёмной вены в объёме 5 мл в вакуумные пробирки с сухим ЭДТА К3. Геномную ДНК животных выделяют из 100 мкл цельной крови.

Образцы ткани берут из ушной раковины щипцами для мечения животных. Полученный образец, площадью около 1 см² помещают в

пробирки типа Эппендорф и заливают 60% раствором спирта. Тотальную ДНК животных выделяют из 50 мкг предварительно подготовленной пробы (тонкий срез ткани, промытый дионизированной водой).

3.2. Выделение нуклеиновых кислот

Для выделения ДНК клетку необходимо разрушить тем или иным способом, а хромосомную ДНК очистить от других клеточных компонентов. Прежде всего нужно отделить ДНК от белков, входящих в состав нуклеопротеидных комплексов хроматина. При этом важно защитить ДНК от действия нуклеаз и максимально сохранить её целостность, поскольку длинные линейные молекулы ДНК при их изоляции из клетки неизбежно фрагментируются.

Методы выделения ДНК обычно включают следующие этапы:

1) лизис клеток (или разрушение физическим, механическим способом);

2) ферментативное разрушение белков протеиназами и/или депротеинизацию клеточного лизата с помощью фенола и хлороформа;

3) центрифугирование для удаления денатурированных белков и фрагментов клеточных органелл. Затем ДНК осаждают из раствора этанолом, и после центрифугирования растворяют осадок в буферном растворе. Вместе с ДНК частично выделяется и РНК, от которой избавляются с помощью фермента РНКазы.

Для выделения ДНК используют биологический материал, в котором ДНК находится в целостном состоянии, лучше всего подходит ткань, где клетки активно делятся и растут. Мертвая ткань и ткани опорно-трофической функции, где ДНК встречается в полуразрушенном состоянии, дают слабый выход ампликонов.

Все факторы, которые приводят к разрыву ковалентных связей в исследуемой ДНК и загрязняют пробы чужеродной ДНК, приводят к ошибкам при проведении ПЦР и должны быть исключены. Это прежде всего высокая температура (40–50°C и выше), электромагнитное излучение (ультрафиолет, рентгеновские лучи), радиационное излучение (α , β , γ -лучи), присутствие жизни на исследуемом материале (бактерии, грибы).

Образцы для выделения ДНК можно хранить в морозильной камере. При температуре -5 – -20°C ДНК в клетках сохраняется длительное время, не разрушаясь. Для хранения материала в течение 1-2 суток используется холодильник (2-8°C).

Для выделения ДНК имеется целый ряд протоколов и готовых коммерческих наборов. Применяемая стратегия зависит от биологического материала и поставленных задач.

3.3. Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – метод получения множества копий целевого гена или любого другого участка молекулы ДНК, основанный на механизме естественной репликации ДНК в живых организмах. Идея создания такого метода впервые была высказана в начале 1970-х годов норвежским ученым Къеллу Клеппе. На практике она реализовалась благодаря “переоткрытию” идеи ПЦР в 1983 году Кери Маллисом (Kary Mullis), который за свое открытие в 1993 году был удостоен Нобелевской премии.

Метод ПЦР базируется на идее многократного избирательного копирования (амплификации или размножения) заданного участка ДНК при помощи ДНК-полимеразы в условиях *in vitro* для получения достаточно большого количества копий этого участка, которые могут быть выявлены обычными методами детекции или подвергнуты иным, предусмотренным дизайном эксперимента, манипуляциям. При этом

происходит копирование только строго определенного участка ДНК, который удовлетворяет заданным условиям, и только в том случае, если он присутствует в исследуемом образце.

ПЦР состоит из многократно повторяющихся циклов (25-35), каждый из которых включает три этапа: денатурация (расплетение, плавление) двухцепочечных фрагментов ДНК, “отжиг” (присоединение, гибридизация) праймеров к матрице и полимеризация (удлинение праймеров, элонгация)

Первый этап предусматривает нагрев реакционной смеси до температуры, при которой большинство двухцепочечных фрагментов ДНК будут денатурированы и ДНК распадется на отдельные цепи. При этом температура и продолжительность температурной обработки реакционной смеси подбираются так, чтобы основная часть молекул ДНК-полимеразы осталась в интактном состоянии (обычно от $+93^{\circ}\text{C}$ до $+96^{\circ}\text{C}$, 30-120 сек.).

На втором этапе каждого цикла ПЦР реакционная смесь охлаждается до температуры, оптимальной для комплементарного спаривания праймеров со специфическим участком одноцепочечной ДНК-матрицы (обычно от $+37^{\circ}\text{C}$ до $+65^{\circ}\text{C}$). Праймеры – это короткие (как правило, 18-30 нуклеотидов) химически синтезированные олигодезоксирибонуклеотиды, выполняющие роль инициаторов синтеза цепи ДНК с помощью ДНК-полимеразы. Праймеры комплементарны последовательностям ДНК на левой и правой границах специфического фрагмента и ориентированы таким образом, что достраивание цепи происходит только между ними. Места (сайты) посадки праймеров на ДНК-матрице ограничивают размер того участка ДНК, который будет амплифицирован.

На третьем этапе происходит синтез комплементарных цепей ДНК, который идет в направлении $5' \rightarrow 3'$ и катализируется ДНК-

полимеразой. Материалом для синтеза новых цепей ДНК служат дезоксирибонуклеотидтрифосфаты, добавляемые в реакционную смесь. Продолжительность этапа амплификации составляет, в среднем, 20-40 с и зависит от скорости работы ДНК-полимеразы и размера синтезируемого фрагмента ДНК.

Синтезированные в ходе первого цикла ПЦР цепи ДНК, которые будут несколько длиннее, чем выбранный специфический участок (так как синтез новой цепи ДНК, идущий от праймера, в первом цикле ПЦР заканчивается произвольно), становятся матрицами для следующего цикла амплификации. Вторым циклом ПЦР позволяет получить фрагменты ДНК (ампликоны), равные по длине специфическому участку, фланкированному праймерами. В последующих циклах амплификации ампликоны служат матрицей для синтеза все новых и новых цепей.

Трехступенчатый цикл, в результате которого получают точные копии специфического участка ДНК, повторяется многократно в соответствии с заданной программой термоциклера (амплификатора). В связи с этим, если один цикл продолжается примерно 3 минуты, то менее чем через 2 часа (примерно 30 циклов амплификации) можно получить около миллиарда копий специфической последовательности ДНК. Если предположить, что в исходном растворе первоначально находилась только одна двухцепочечная молекула ДНК, то даже в этом случае за 30-40 циклов синтезируется столько копий специфического фрагмента ДНК, что их концентрация достигнет 10-20 мкг/мл. Такого количества вполне достаточно для достоверного визуального обнаружения продукта ПЦР методом электрофореза в агарозном или полиакриламидном геле после соответствующего окрашивания.

После окончания всех циклов часто проводят дополнительную стадию финальной элонгации, чтобы достроить все одноцепочечные фрагменты. Обычно эта стадия длится 5-15 мин.

3.4. Основные компоненты реакционной смеси ПЦР

ДНК-матрица – ДНК или ее часть, содержащая искомый специфический фрагмент. Тотальная ДНК, экстрагируемая из биологических образцов, представляет собой смесь ядерной и митохондриальной ДНК. Выделение ядерной ДНК возможно только через выделение и очистку клеточных ядер. Однако, как показывает практика, присутствие митохондриальной ДНК не мешает проведению ПЦР с использованием праймеров, специфичных для локусов ядерной ДНК, и наоборот.

Качество и количество ДНК являются важными факторами для ПЦР. При отсутствии ДНК-мишени специфический продукт амплификации не образуется. Для обнаружения нуклеиновых кислот образец пробы, используемый в реакции амплификации, должен содержать, по меньшей мере, одну полноразмерную копию исследуемой нуклеотидной последовательности. Большое число копий нуклеиновых кислот повышает вероятность проведения успешной амплификации необходимого фрагмента. В то же время избыток количества образца ДНК увеличивает выход неспецифических ПЦР-ампликонов. Наличие односторонних разрывов в нативной ДНК блокирует процесс амплификации. Амплифицируемая последовательность может быть длиной от нескольких десятков до нескольких десятков тысяч нуклеотидов. Для проведения амплификации обычно используют 0,1–1 мкг геномной ДНК млекопитающих.

Термостабильная ДНК-полимераза – фермент, который катализирует реакцию полимеризации ДНК путем последовательного присоединения нуклеотидных оснований к 3'-концу растущей цепи

синтезируемой ДНК, сохраняя свою активность при высокой температуре длительное время.

Первая термостабильная ДНК-полимераза (Taq-полимераза) в 1976 г. была изолирована от термофильной бактерии *Thermus aquaticus*, живущей в горячих источниках. Этот термостабильный фермент катализирует реакцию полимеризации ДНК путем последовательного присоединения нуклеотидных оснований к 3'-концу растущей цепи синтезируемой ДНК, согласно принципу комплементарности и выдерживает высокую температуру на всех этапах амплификации в течение нескольких десятков циклов, без потери своей активности.

Taq-ДНК-полимераза представляет собой мономерный белок с молекулярной массой 94 кДа, состоящий из двух глобулярных пространственно разделенных доменов: полимеризационного, осуществляющего встраивание нуклеотидов в растущую цепь ДНК, и домена, обладающего 5'-3'-эксонуклеазной активностью. Благодаря 5'-3'-эксонуклеазной активности Taq-ДНК-полимераза расщепляет небольшие фрагменты ДНК, присоединенные к цепи ДНК, которая используется в качестве матрицы при полимеризации. Такое свойство фермента нашло применение в количественных методиках ПЦР для разрушения флуоресцентных зондов.

Температурный оптимум ферментативной активности Taq-ДНК-полимеразы составляет +72...+80 °С (~ 150 нуклеотидов/с), фермент сохраняет свою активность при длительной инкубации при 95 °С (~ 40 мин) и существенно снижает активность при уменьшении температуры (при +37 °С ~ 1,5 нуклеотида/с). Высокий температурный оптимум реакции, катализируемой данной полимеразой, позволяет подбирать более жесткие температурные условия отжига, обеспечивающие гибридизацию праймеров только в заданном участке ДНК, тем самым приводя к повышению специфичности и чувствительности реакции.

Смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (dNTP) - «строительный материал», используемый термостабильной полимеразой для синтеза второй цепи ДНК. В реакционную смесь дезоксинуклеотидтрифосфаты (дезоксиаденозинтрифосфат (dATP), дезоксигуанозинтрифосфат (dGTP), дезоксицитозинтрифосфат (dCTP), дезокситимидинтрифосфат (dTTP)) добавляют в эквивалентных концентрациях.

В зависимости от выбранного фермента в ПЦР используют различные концентрации dNTP, что напрямую связано с кинетическими параметрами полимераз. Обычно при подборе оптимальных условий проведения реакции используют концентрации от 50–500 мкМ с целью установления оптимального баланса между эффективностью, специфичностью и точностью работы ДНК-полимераз. Избыток dNTP приводит к снижению специфичности и эффективности, особенно при несоответствующей концентрации Mg^{2+} . Теоретически dNTP, взятые в концентрации 200 мкМ (каждый) при постановке реакции в объеме 25 мкл, с использованием Taq-полимеразы и при концентрации $MgCl_2$ 1,5 мМ (с использованием 10-кратного ПЦР-буфера) позволяют синтезировать около 6–6,5 мкг ДНК.

Буферный раствор - один из наиболее важных ингредиентов, влияющих на результаты ПЦР, особенно его солевая часть и концентрация ионов Mg^{2+} . Буферный раствор для ПЦР является солевым раствором смеси катионов и анионов, взятых в определенной концентрации, обеспечивающей необходимые оптимальные условия для протекания реакции амплификации, поддержания pH и ионной силы раствора. Амплификация происходит при постоянном pH и солевом составе, что обеспечивается буферной емкостью раствора.

Соли Mg – источник ионов Mg^{2+} , необходимых для поддержания активности ДНК-полимеразы, один из наиболее важных факторов для оптимизации проведения ПЦР. Их концентрация влияет на процесс

отжига праймеров, температуру плавления двойной спирали нуклеиновых кислот, активность и точность функционирования ДНК-полимеразы. Концентрация ионов Mg^{2+} должна превышать концентрацию дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (dNTP) в реакционной смеси на 0,5–3,0 мМ. Такой избыток необходим, так как основным источником фосфатных групп во время ПЦР являются dNTP, а ионы Mg^{2+} образуют с ними растворимый комплекс. Увеличение концентрации Mg^{2+} оказывает существенное влияние на специфичность и эффективность протекания реакции амплификации, приводя к повышению температуры плавления ДНК и увеличению выхода продукта, эффективному отжигу праймеров, но в то же время, способствуя уменьшению специфичности, появлению неспецифических продуктов. При уменьшении концентрации Mg^{2+} выход продукта, наоборот, снижается. Оптимум концентрации ионов Mg^{2+} зависит от последовательностей выбранной мишени и праймеров. В стандартной ПЦР используются концентрации в пределах 1,5–2 мМ Mg^{2+} . В зависимости от типа используемого реакционного буфера ионы вносят в виде хлорида, сульфата или ацетата магния. Различные ДНК полимеразы могут иметь свои требования к концентрации Mg^{2+} и его источникам. Для Taq ДНК-полимеразы оптимум концентрации Mg^{2+} варьируется от 1 до 4 мМ $MgCl_2$.

Праймеры – синтетические олигонуклеотиды (16–30 нуклеотидов), комплементарные последовательностям ДНК на границах определяемого специфического фрагмента. Праймеры используют, как правило, попарно (прямой и обратный), подбирая таким образом, чтобы они были комплементарны противоположным цепям ДНК в участках, ограничивающих выбранную область, ориентированы 3'-концами в направлении последовательности, которую необходимо амплифицировать, т. е. навстречу друг другу. Оптимизация праймеров

для ПЦР сводится к их «дизайну» (выбору нуклеотидной последовательности) и определению оптимальной температуры для их отжига (связывание с ДНК-матрицей).

Выбор участка на ДНК-матрице. Это один из самых важных шагов в планировании эксперимента. Необходимо, чтобы пара праймеров эффективно и специфично связывалась с искомой целевой последовательностью. Других вариантов связывания праймеров с ДНК-матрицей быть не должно, по крайней мере для той ДНК, которую необходимо выделить из исследуемого материала. Информацию о последовательности нуклеотидов целевого фрагмента (или только его концов) можно получить в базе данных международного генбанка (доступна на веб-сайте www.ncbi.nlm.nih.gov). Длина целевого фрагмента должна быть в пределах 100-3000 п.н., нижний предел обусловлен возможностью отделения амплифицированных фрагментов (ампликоны) от димеров праймеров и других неспецифических фрагментов на электрофореze, верхний предел - возможностями TaqДНК-полимеразы, не способной эффективно синтезировать фрагменты большей длины.

Оптимальная длина и размер праймеров. Этот показатель определяется возможностью отжига праймера одновременно по всей его длине и находится между 16 и 25 нуклеотидами и в среднем составляет 18-20 нуклеотидов.

Содержание ГЦ (GC), %. Это отношение числа нуклеотидов dG и dC (суммарно) к общему числу нуклеотидов праймера. Необходимо подбирать последовательность праймера так, чтобы значение величины GC (%) находилось между 35 и 65 (некоторые источники предлагают 45-55) и было приблизительно одинаковым у праймеров, составляющих пару для ПЦР. Нельзя допускать, чтобы было несколько (3 и более) оснований dG и dC подряд на 3'-конце праймера: это сильно снижает его специфичность. В идеале все

четыре нуклеотида должны быть более или менее равномерно распределены по всей длине праймера.

Температура отжига (Т°С). Это температура, при которой вероятность связывания праймера с ДНК-матрицей превосходит 70 %. Для пары праймеров она на 4 – 5°С (по некоторым источникам на 2-4°С) ниже температуры плавления (Т_m°С) - температуры, при которой число связанных с ДНК и свободных олигонуклеотидов одинаково. Оптимальная температура отжига должна находиться в пределах 50-70°С, и не может различаться между прямым и обратным праймерами более чем на 4°С. Рассчитать температуру плавления для подобранных праймеров (°С) можно по формулам:

$$T_m = 2(A+T)+4(G+C) - \text{для праймеров до 20 н.};$$

$T_m = 69,3+0,41(\% GC)-650/l$, - для праймеров более 20 н., где l - длина праймера.

Ориентировочную температуру отжига для каждой пары праймеров можно рассчитать, исходя из минимальной температуры плавления (на 2-4°С ниже), рассчитанной для каждого из двух праймеров, но точно ее установить можно только эмпирически по результатам серии ПЦР, проведенных с разной температурой отжига, начиная с расчетной и ниже с шагом 1-2°С.

Расчет количества праймеров для ПЦР-смеси. Производители, синтезирующие праймеры на заказ, как правило, указывают концентрацию праймера в полученном растворе, например 100 пкмоль/мкл или 100 мМ. Для приготовления реакционной смеси требуется, как правило, 10-20 пкмоль каждого из пары праймеров.

3.5. Программа амплификации

Предварительный нагрев обеспечивает полную денатурацию матрицы, а так же инактивацию каких-либо посторонних белков (например, протеаз или нуклеаз), присутствующих в пробе. Начальная денатурация проводится при температуре от $+92^{\circ}\text{C}$ до $+96^{\circ}\text{C}$ на протяжении 0,5-10 мин. Температура и продолжительность этого этапа во многом определяется характеристиками матрицы. Если матрица примерно на 50% состоит из GC нуклеотидов, то для ее полной денатурации достаточно 1-3 мин. при $+95^{\circ}\text{C}$. Однако, если она обогащена GC нуклеотидами, то для ее полной денатурации может понадобиться более продолжительное время (до 10 мин.) и более высокая температура (до $+96^{\circ}\text{C}$). При этом следует помнить, что в такой ситуации *Taq* ДНК-полимераза должна добавляться в реакционную смесь только после этапа предварительного нагрева (во избежание ее инактивации).

Первый этап цикла: денатурация, проводится при температуре от $+92^{\circ}\text{C}$ до $+95^{\circ}\text{C}$ на протяжении 30-120 сек. Температура и время денатурации выбираются как компромисс: с одной стороны, как можно более полно денатурировать матрицу, но, с другой стороны, не сильно повредить матрицу и *Taq* ДНК-полимеразу. Если матрица обогащена GC нуклеотидами, то продолжительность этапа денатурации может быть увеличена до 3-4 мин. Для решения проблемы денатурации матрицы используют дополнительные компоненты (диметилсульфоксида или формамида) в реакционной смеси, снижающие температуру плавления, или же заменяют в реакционной смеси дезоксигуанозинтрифосфата на 7-деаза-дезокси-гуанозинтрифосфат.

Второй этап цикла: «отжиг», проводится при температуре $+55-65^{\circ}\text{C}$ на протяжении 10-120 сек. Целесообразно подобрать ее

экспериментальным путем. Начиная с расчетной градиентно повышать или снижать температуру «отжига» на 2-5^oС. При этом следует учитывать, что чем выше температура «отжига», тем выше специфичность ПЦР. Но как только она превышает некую критическую величину (для данной пары праймеров), то выход конечного продукта начинает резко падать.

Третий этап цикла: элонгация, проводится при температуре +72^oС на протяжении 10-120 сек. Указанная температура соответствует температурному оптимуму Таq ДНК-полимеразы. Однако эта температура приемлема не для всех случаев. Так, при температуре +65^oС синтез, осуществляемый Таq ДНК-полимеразой, существенно меньше зависит от характера матрицы, а матрицы, содержащие ~90% АТ-нуклеотидов, удаётся амплифицировать, снизив температуру до +60^oС (при этом скорость синтеза составляет 1 тыс. нуклеотидов в минуту).

Продолжительность этапа элонгации определяется размером амплифицируемого фрагмента и скоростью работы Таq ДНК-полимеразы: при температуре от +75^oС до +80^oС скорость ее работы равна ~150 нукл./сек., при +70^oС – 60 нукл./сек., при +55^oС – 24 нукл./сек., при +37^oС – 1,5 нукл./сек., а при +22^oС – 0,25 нукл./сек.

Количество циклов. В стандартном варианте ПЦР обычно используется 25-35 циклов амплификации. Слишком большое число циклов амплификации чревато насыщением реакции, могут синтезироваться длинные продукты, а так же возможно накопление одноцепочечных продуктов и синтез коротких продуктов (из-за истощения запаса нуклеотидов в реакционной смеси).

Финальная элонгация– дополнительный цикл амплификации, в котором этап элонгации удлинён до 5-15 мин.

3.6. Модификации ПЦР метода

Для повышения специфичности, чувствительности и воспроизводимости результатов используют различные модификации метода ПЦР.

ПЦР с «горячим» стартом (Hot-start PCR). Особенностью метода является предотвращение возможности начала реакции до момента достижения в пробирке условий, обеспечивающих специфический отжиг, что уменьшает риск образования неспецифических продуктов амплификации. Во время подготовки ПЦР-смеси (с момента, когда все необходимые компоненты реакции смешаны, до начала стадии денатурации) могут образоваться неспецифичные димеры праймеров-матриц и их амплификация. Данный эффект обусловлен прежде всего зависимостью температуры плавления праймера от его GC-состава и размера. При оптимизации реакции температура отжига праймера близка к температуре плавления, при этом праймер образует двухцепочечную молекулу только при условии его полной комплементарности, обеспечивая специфичность реакции.

Решением этой проблемы является добавление одного из компонентов реакционной смеси (праймера, полимеразы, $MgCl_2$) только после прохождения стадии денатурации. Наряду с этим были разработаны два подхода, позволяющие ингибировать подобную неспецифическую амплификацию. Первый из них подразумевает физическое разделение компонентов реакции (например, при помощи воска, парафина, при этом в нижней части реакционной смеси находятся праймеры, в верхней – Taq-полимераза и ДНК-мишень), пока рабочая смесь не достигнет температуры $+55...+58$ °C. Вторым – использование модифицированных ДНК-полимераз и моноклональных антител к ним: AmpliTaq™ plus, AmpliTaq Gold™, TaqStart™ Antibody, Affinity-Immobilized Taq и т. д. – с предварительным прогревом рабочей

смеси при 80 °С в течение 2–10 мин для их активации. Фермент, связанный с моноклональными антителами, становится активным лишь после стадии первой денатурации, когда моноклональные антитела необратимо денатурируют и освобождают активные центры ДНК-полимеразы.

Во всех перечисленных случаях, даже если неспецифический отжиг произошел до начала температурного циклирования, элонгации не происходит, а при нагревании комплексы праймер-ДНК денатурируют, поэтому неспецифические продукты не образуются. В дальнейшем температура в пробирке не опускается ниже температуры плавления, что обеспечивает образование специфического продукта амплификации.

Touchdown ПЦР. С помощью Touchdown (Stepdown) ПЦР уменьшают влияние неспецифического связывания праймеров, приводящего к амплификации неспецифической последовательности ДНК. Температурой отжига праймеров во время цикла ПЦР определяется специфичность их отжига. Точка плавления праймера устанавливает верхний предел температуры отжига. При температурах несколько ниже этой точки, только при наличии очень специфической последовательности, возникает спаривание между праймером и ДНК-мишенью. При более низких температурах праймеры связываются менее специфично. Неспецифическое связывание праймера приводит к неопределенным результатам ПЦР. При постановке данной реакции первые циклы проводят при температуре выше температуры отжига, затем каждые несколько циклов температуру снижают на 1–2°С. При определенной температуре система пройдет через полосу оптимальной специфичности праймеров к ДНК. Таким образом, удастся избежать несоответствия между рассчитанной температурой плавления

праймера и реальной оптимальной (для данных конкретных условий) температурой его отжига.

Мультиплексная ПЦР. Позволяет осуществлять одномоментное определение различных локусов путем использования нескольких пар праймеров, проводя амплификацию нескольких ДНК-матриц, или ДНК-мишеней в одной пробирке. Праймеры, используемые в «мультиплексной» ПЦР, должны иметь схожую температуру отжига и не быть комплементарными друг к другу (для предотвращения их димеризации). К недостаткам этого метода можно отнести более низкую чувствительность, а также сложность интерпретации результатов анализа. К преимуществам – возможность одновременного определения нескольких ДНК-мишеней в одной ПЦР-реакции, что приводит к снижению количества манипуляций и себестоимости исследований.

Гнездовая ПЦР (Nested PCR, «вложенная» ПЦР). Используется для уменьшения числа побочных продуктов реакции, повышения чувствительности и специфичности, благодаря использованию двух пар праймеров, специфичных в отношении ДНК-мишени, и проведению двух последовательных реакции ПЦР. Вначале осуществляют амплификацию определенного фрагмента ДНК с помощью внешних праймеров, обычно в течение 15–30 циклов. Небольшое количество образовавшегося продукта амплификации в результате первого этапа без какой-либо очистки далее используют в качестве матрицы на втором этапе амплификации. Вторая пара внутренних праймеров амплифицирует участок ДНК внутри продукта первой реакции амплификации. Поскольку только у специфического продукта амплификации будут присутствовать участки для гибридизации внутренних праймеров, амплификация всех остальных, неспецифических продуктов происходить не будет. Недостатком данного метода является более высокий риск контаминации в

лаборатории, как следствие, получение ложноположительных результатов; более высокие трудозатраты при постановке реакции. В то же время данная реакция обладает высокой чувствительностью и специфичностью, за счет разведения образца происходит снижение концентрации ингибиторов ПЦР при переносе ампликона из одной пробирки в другую.

Ассиметричная ПЦР (Single-sided PCR). Используется когда необходимо амплифицировать преимущественно одну из цепей исходной ДНК (в некоторых методиках секвенирования и гибридизационного анализа, ДНК-чипах, исследования полиморфизма одноцепочечных фрагментов ДНК) и наработать одноцепочечные фрагменты ДНК-мишени. ПЦР проводится как обычно, за исключением того, что один из праймеров берется или в большом избытке по сравнению со вторым праймером или используется в отсутствие второго праймера. Быстрое истощение второго праймера в процессе амплификации приводит к тому, что синтез ДНК продолжается только с одного праймера, приводя к линейному накоплению одноцепочечных продуктов амплификации.

Аллель-специфическая ПЦР. Метод аллель-специфической ПЦР используют при обнаружении мутаций в геномной ДНК, который позволяет находить небольшое число мутантных ДНК на фоне большого числа молекул дикого типа. Для детекции мутантной ДНК используют аллель-специфические праймеры, полностью комплементарные лишь мутантным последовательностям, что обеспечивает амплификацию только мутантной ДНК, а ДНК дикого типа в реакцию не вступает. Аллельные варианты различаются за счет того, что 3'-концевой нуклеотид одного из праймеров гибридизуется непосредственно с варибельным нуклеотидом (позиция SNP), чем обуславливается наличие или отсутствие ПЦР. Подобный подход позволяет обнаружить несколько десятков или

сотен молекул мутантной ДНК на фоне десятков тысяч молекул ДНК дикого типа. Для усиления специфичности действия праймеров вблизи их 3'-концов могут быть введены некоплементарные матрице нуклеотиды.

Другой тип универсальных аллель-специфических праймеров содержит 3'-концевой нуклеотид, всегда некоплементарный матрице, а мутантный нуклеотид матрицы находится в его внутренней части. В этом случае продукты амплификации отсутствуют, если в гибриде во внутреннюю часть праймера попадает любой некоплементарный мутантный нуклеотид матричной ДНК вне зависимости от его точной локализации. Такие праймеры позволяют обнаруживать любые точечные мутации в гомозиготном состоянии и у гаплоидных микроорганизмов.

Для выявления гетерозиготного состояния анализируемого гена иногда используют мутантный и нормальный праймеры разных размеров, которые различаются по длине их 5'-концевых последовательностей, полностью комплементарных анализируемой ДНК. В этом случае в процессе ПЦР в реакционную смесь можно одновременно добавлять оба аллель-специфических праймера: мутантный и нормальный – вместе с общим для обоих праймеров – встречным. Образовавшиеся продукты реакции, соответствующие мутантному аллелю и аллелю дикого типа, далее разделяют электрофоретически в гелях, применяемых для секвенирования нуклеиновых кислот.

При использовании аллель-специфических праймеров для обнаружения мутаций необходимо иметь в виду, что не все сочетания ошибочно спаренных с матрицей 3'-концевых нуклеотидов одинаково эффективны в блокировании ПЦР. Наименьшей способностью к элонгации праймеров с ошибочно спаренными 3'-концевыми нуклеотидами обладает так называемый фрагмент Шоффлера Taq-

полимеразы, который представляет собой молекулу ДНК-полимеразы *T. aquaticus*, укороченную с N-конца. В то же время в этом методе неприменимы термостабильные ДНК-полимеразы, обладающие 3'-5'-корректирующей активностью, например Vent-полимераза. ПЦР с аллель-специфическими праймерами является простым и эффективным методом обнаружения мутаций в геномной ДНК организмов.

RAPD-ПЦР (Random Amplification of Polymorphic DNA PCR, ПЦР со случайной амплификацией полиморфной ДНК, AP-PCR, ПЦР с произвольными праймерами). В этом методе обычно используют один праймер небольшого размера (10–15 п.н.) со случайной последовательностью нуклеотидов при низкоспецифических условиях амплификации. Этот праймер будет частично комплементарен случайным участкам ДНК исследуемых организмов. Амплифицируются только регионы, фланкирующие места связывания праймера на комплементарных цепях ДНК. Таким образом, продукт амплификации будет образовываться только в том случае, если инвертированные повторяющиеся последовательности, которые содержат в себе сайт посадки такого праймера, будут располагаться в анализируемом геноме достаточно близко друг от друга, на расстоянии, допускающем эффективное прохождение полимеразной реакции. Подбирая условия (длину праймера, его состав, температуру и пр.), удается добиться удовлетворительного отличия картины ПЦР для двух организмов. Используется как таксономический инструмент, когда нужно различить близкие по генетической последовательности организмы, например, разные породы сельскохозяйственных животных.

ПЦР длинных фрагментов (Long-range PCR, Long PCR, LPPCR), представляет собой модификацию ПЦР, предназначенную для амплификации протяженных участков ДНК (10 тыс. оснований и

больше). Используют смесь двух полимераз, одна из которых – Taq-полимераза с высокой процессивностью (т. е. способная за один проход синтезировать длинную цепь ДНК), а вторая – ДНК-полимераза с 3'-5'-эндонуклеазной «проверочной активностью» (proofreading activity). Вторая полимераза необходима для того, чтобы корректировать ошибки, внесенные первой. Причем полимераза, не имеющая 3'-5'-экзонуклеазной активности, является основной, а высокоточные полимеразы с корректирующей активностью присутствуют в небольших концентрациях (например, Pfu- или Deep Vent-ДНК-полимеразы). Данная смесь полимераз позволяет преодолевать проблемы, связанные с низкой точностью синтеза ДНК Taq-полимеразой.

Имеется ряд факторов, ограничивающих в обычных условиях проведение амплификации протяженных последовательностей ДНК с высокой точностью. Это депуринизация ДНК при высоких температурах, используемых для денатурации ДНК; подавление элонгации растущих цепей ДНК стабильными элементами вторичной структуры амплифицируемых одноцепочечных участков матрицы; слишком короткое время элонгации праймеров в соответствующих сегментах ПЦР; фрагментация матричной ДНК. Частично данные затруднения преодолевают путем повышения значений pH реакционной смеси при проведении реакции амплификации, что подавляет протонирование пуриновых оснований, которое само по себе ускоряет процесс депуринизации. Проблема вторичной структуры матрицы может быть решена включением в состав реакционной смеси денатурирующих агентов типа диметилсульфоксида, а третье затруднение – увеличением продолжительности элонгации праймеров при температуре + 72 °С. Образование двухцепочечных разрывов матрицы можно предотвратить, выделяя ДНК в более мягких условиях. Данный метод

находит применение при обнаружении крупных перестроек геномной ДНК, сопровождающихся экспансией тринуклеотидных повторов, выявления протяженных транслокаций, а также для амплификации целых генов.

ПЦР с обратной транскрипцией (Reverse Transcription PCR, RT-PCR, ОТ-ПЦ) используется для амплификации, выделения или идентификации известной последовательности из рибонуклеиновой кислоты (РНК). Синтез одноцепочечной молекулы кДНК проводят на матрице мРНК с помощью фермента ревертазы (обратной транскриптазы, РНК-зависимой ДНК полимеразы), которая дальше используется в качестве матрицы для постановки классической ПЦР.

Тақ-полимераза неспособна осуществлять синтез однострессовой ДНК на РНК-матрице. Различаются следующие форматы постановки реакции обратной транскрипции (ОТ, RT):

- отдельная реакция со случайными затравками, или Random-hexanucle-otides;

- отдельная (раздельная) реакция со специфическим праймером или сдвинутым вправо (двухшаговая реакция). Данный вариант реакции используется для анализа сложных смесей РНК или при необходимости транскрибирования очень длинных последовательностей;

- совмещенная с ПЦР реакция с использованием одной пары праймеров (одношаговая реакция, однопробирочная реакция).

В 1991 г. Т. W. Myers и D. H. Gelfand охарактеризовали термостабильный фермент – ДНК-зависимую ДНК-полимеразу, выделенную из бактерии *Thermus thermophilus* (Tth-полимеразу), которая в присутствии ионов марганца (Mn^{2+}) катализирует синтез на РНК однострессовой комплементарной ДНК, проявляя при этом активность РНК-зависимой ДНК-полимеразы. В присутствии ионов Mg^{2+} у нее проявляется активность обычной ДНК-полимеразы,

сравнимой с таковой у Taq-ДНК-полимеразы. Благодаря этим свойствам, фермент используется для одновременного проведения обратной транскрипции и амплификации в одной пробирке, а также позволяет получать более длинные продукты амплификации. Данный метод широко используется для оценки дифференциальной экспрессии генов на уровне транскрипции.

ПЦР в реальном времени (PCR Real-Time). Метод ПЦР с детекцией продукта амплификации в режиме реального времени основан на количественной флуоресцентно-гибридизационной детекции специфических продуктов амплификации, в которой флуоресцентная репортерная молекула (интеркалирующий двухцепочечную ДНК краситель, флуорофор) используется для наблюдения за развитием реакции амплификации, а увеличение интенсивности репортерной флуоресценции прямо пропорционально увеличению количества ампликонов. Чем меньше размер продукта, тем точнее уровень репортерной флуоресценции отражает его количество.

При постановке ПЦР в реальном времени флуоресценция положительных образцов увеличивается с каждым циклом амплификации, в то время как отрицательные образцы остаются на уровне базовой флуоресценции. Распознавание положительных образцов осуществляют с помощью алгоритмов компьютерной программы, которая анализирует изменения флуоресценции в каждом цикле. Точность количественного определения при постановке ПЦР в реальном времени зависит от используемых стандартов, а также от количества копий специфического фрагмента в анализируемом образце. Эффективность реакции амплификации может иметь существенные различия при использовании низкокопийных образцов.

Данный метод имеет ряд несомненных преимуществ по сравнению с традиционной ПЦР. Амплификация и анализ продукта

амплификации осуществляется одновременно в процессе реального времени, информация о продукте накапливается во время амплификации (количественный анализ) в одной и той же пробирке и в одном и том же инструменте. Отсутствует пост-ПЦР-обработка продуктов амплификации, отсутствует необходимость переноса образца, добавления реагентов и проведения электрофореза, как следствие, нет необходимости удалять образец из закрытых пробирок, что ведет к снижению риска контаминации продуктами амплификации (менее жесткие требования к организации ПЦР-лаборатории), обуславливая высокую производительность реакции и быстрый процесс амплификации (термоциклирования). В числе преимуществ также объективность проведенных исследований, автоматический учет результатов. Количественный анализ при ПЦР в реальном времени охватывает широкий динамический диапазон (до 10¹⁰), необходимое количество РНК в 1000 раз меньше, чем при постановке традиционной ПЦР (3 pg = 1 геномный эквивалент). Процесс детекции способен обнаружить двукратное изменение продукта, отсутствует влияние неспецифической амплификации, возможность подтверждения специфической амплификации путем анализа кинетической кривой плавления.

Базовый уровень флуоресценции (base line) – это уровень флуоресценции, наблюдаемый в реакционной смеси до появления репортерного сигнала. Свободный зонд, находясь в растворе в контакте с гасителем флуоресценции, создает небольшой базальный уровень флуоресценции, который преодолевается по мере накопления свободного флуорофора в реакционной смеси. Управляющие программы современных амплификаторов, работающие в режиме реального времени, позволяют задать базовый уровень тремя путями: установки среднего значения в диапазоне циклов (average over cycle range); установки минимального значения в

диапазоне циклов (minimum over cycle range); тотальный минимум (minimum over all data). При этом необходимо выбрать такой путь, при котором обеспечивался бы минимальный уровень флуоресценции до появления репортерной флуоресценции, что позволяет детектировать начало экспоненциальной фазы с большой точностью. Наиболее часто базовый уровень флуоресценции выбирают как среднее значение в достаточно широком диапазоне циклов до появления репортерной флуоресценции (до начала детекции экспоненциальной фазы). Особенности выбора базовой линии зависят от типа проведения ПЦР в реальном времени.

В идеальных условиях на каждом цикле цепной реакции происходит удвоение количества продукта. ПЦР в реальном времени позволяет оценивать количества субстрата при условии, что эффективность реакции и заданный уровень пороговой флуоресценции одинаковы для каждой из сравниваемых реакций. Уровень пороговой флуоресценции PC(T) (threshold) должен быть одинаков для всех сравниваемых образцов.

Данная реакция занимает меньше времени, более специфична, чувствительна и воспроизводима, чем традиционная ПЦР. В то же время эта методика не идеальна для мультиплексной ПЦР, ее постановка требует довольно высоких технических навыков, высока стоимость оборудования, велик коэффициент вариаций при анализе одних и тех же проб.

3.7. Основные виды полимераз

Тaq ДНК-полимераза. Рекомбинантный фермент выделен из штамма *E. coli*, несущего ген Таq ДНК-полимеразы термостабильной бактерии *Thermus aquaticus* YТ1. Фермент предназначен для рутинных аналитических исследований.

Область применения:

- амплификация ДНК (до 5 т.п.о.);
- ПЦР-скрининг;
- ник-трансляция (смещение разрыва - метод получения меченых зондов, основанный на замене нуклеотидов в двухцепочечной ДНК радиоактивно или и флуоресцентно мечеными нуклеотидами).

Основные свойства Таq ДНК-полимеразы:

- температурный оптимум активности 70-74°C;
- 5'->3' экзонуклеазная активность;
- длина амплифицируемых фрагментов до 5 т. п. о.;
- возможность клонирования продуктов ПЦР в ТА-вектор.

HS Таq ДНК-полимераза представляет собой смесь рекомбинантного фермента Таq ДНК-полимеразы и специфических моноклональных антител к полимеразе. HS Таq ДНК-полимераза неактивна в условиях приготовления реакционной смеси. Активация фермента происходит в течение первой денатурации. При температуре более +70°C комплекс ДНК-полимеразы с антителом диссоциирует. Наличие "горячего старта" существенно повышает чувствительность и специфичность реакции.

Область применения:

- амплификация ДНК в рутинных аналитических исследованиях;
- мультиплексная ПЦР;
- ПЦР в режиме реального времени.

Основные свойства HS Таq ДНК-полимеразы:

- быстрый "горячий старт" в первом цикле денатурации(95°C, 5-10 сек);
- температурный оптимум активности 70-74°C;
- увеличенная специфичность амплификации по сравнению сTaq ДНК-полимеразой;
- 5'->3' экзонуклеазная активность;
- длина амплифицируемых фрагментов до 5 т. п.о.;
- возможность клонирования продуктов ПЦР в ТА-вектор.

Encyclo полимераза – специально разработанная смесь термостабильных ДНК полимераз с «горячим стартом» для эффективной амплификации фрагментов ДНК с широкого спектра матриц, в том числе фрагментов ДНК длиной до 20 т.п.о. Полимераза содержит антитела, блокирующие ее активность при комнатной температуре. Фермент активируется только после прогрева реакции. Encyclo-полимераза обеспечивает высокую эффективность реакции и обладает повышенной точностью синтеза по сравнению с Taq-полимеразой.

Область применения Encyclo полимеразы:

- амплификация длинных фрагментов (до 20 т.п.о.);
- амплификация сложных смесей ДНК, образцов тотальной кДНК;
- ПЦР с малых количеств ДНК;
- амплификация низкокопийных последовательностей со сложных матриц (геномная ДНК, первая цепь кДНК и т.п.);
- ПЦР в реальном времени с интеркалирующими красителями (SYBR Green и др.).

Свойства Encyclo полимеразы:

- высокопроцессивная 5'>3' ДНК полимеразная активность
- корректирующая 3'>5' экзонуклеазная активность;
- автоматический "горячий старт";
- высокая специфичность;

- высокий выход продукта полимеразной реакции;
- возможность клонирования продуктов ПЦР в Т-вектора

Tersus полимеразы представляет смесь термостабильных ДНК полимераз для высокоточной и специфичной амплификации фрагментов ДНК с широкого спектра матриц. Tersus полимеразы комплектуется улучшенным Tersus Plus буфером, увеличивающим эффективность ПЦР.

Область применения Tersus полимеразы:

- амплификация фрагментов ДНК для переклонирования;
- сайт-направленный мутагенез;
- амплификации ДНК-фрагментов для дальнейшего секвенирования;
- высокоспецифичная ПЦР со сложных ДНК матриц;
- ПЦР в реальном времени с интеркалирующими красителями (SYBR Green и др.

Основные свойства Tersus полимеразы:

- высокая точность синтеза;
- 5'>3' ДНК-полимеразная активность (до 3 т.п.н.);
- отсутствие 5'>3' экзонуклеазной активности;
- корректирующая 3'>5' экзонуклеазная активность;
- быстрый "горячий старт" в первом цикле денатурации (5-10 сек, 95°C);
- высокая специфичность амплификации;
- возможность клонирования продуктов ПЦР в ТА-вектор.

SNP detect – высокоточная полимеразы с горячим стартом, разработанная для детекции однонуклеотидных полиморфизмов (SNP). Фермент также может быть использован для высокоточной и специфичной амплификации фрагментов ДНК длиной до 1000 п.о. с широкого спектра матриц.

Область применения:

- SNP генотипирование: аллель-специфичная ПЦР (AS-PCR), аллель-специфичное удлинение праймера (AS-PEX), минисеквенирование;

- высокоспецифичные ПЦР, в том числе мультиплекс ПЦР;
- высокоточная амплификация фрагментов до 1000 п.о.;
- ПЦР в реальном времени с использованием интеркалирующих красителей (SYBRGreen I, EVA Green)

Основные свойства фермента:

- 5'>3' ДНК-полимеразная активность;
- отсутствие 5'>3' и 3'>5' экзонуклеазной активности;
- высокая точность синтеза ДНК из дезокси- и дидезоксинуклеотидов;
- высокая специфичность, низкий уровень фоновой амплификации;
- быстрый "горячий старт" в первом цикле денатурации (5-10 сек, 95°C);
- возможность клонирования продуктов ПЦР в TA-вектор (TA-cloning);

Ограничения к использованию:

- из-за отсутствия 5'>3' экзонуклеазной активности SNPdetect полимеразы не может использоваться для ПЦР в реальном времени с флуоресцентными зондами (TaqMan);
- не рекомендуется использовать SNPdetect для амплификации фрагментов длиной свыше 1000 п.о.

3.8. Метод ПЦР-ПДРФ

Метод ПЦР-ПДРФ (полимеразная цепная реакция – полиморфизм длин рестрикционных фрагментов) – универсальный метод определения нуклеотидной последовательности ДНК у различных видов живых организмов. Возможность использовать

ПДРФ как генетический маркер, была предложена в 1974 г. при исследовании термочувствительных локусов в геноме аденовируса. В дальнейшем, в работах D. Botstein и др. (1980), были представлены теоретические аспекты ПДРФ и детально проработанные методы применения его в качестве маркера полиморфизма определенной нуклеотидной последовательности геномной ДНК. После открытия ПЦР и синтеза двух подходов, метод ПЦР-ПДРФ приобрел большую популярность и широкую апробацию, в том числе при изучении последовательностей уникальных генов сельскохозяйственных животных, связанных с экономически значимыми признаками продуктивности.

Метод ПЦР-ПДРФ основан на специфических особенностях определенных групп ферментов (эндонуклеаз рестрикции) катализировать реакцию гидролиза амплифицированного фрагмента. Наличие участков рестрикции и их распределение в изучаемом образце предопределено расположением нуклеотидов в исследуемом фрагменте. Для любой точечной мутации, обусловленной заменой нуклеотидов, может быть подобрана рестриктаза, разрезающая последовательность именно в том месте, где необходимо установить наличие или отсутствие мутации. При наличии мутации исследуемый участок не подвергается воздействию рестриктазы и его длина остается неизменной, при отсутствии – рестриктаза разрезает его на соответствующие фрагменты заданной длины. Расщепление анализируемого участка определенными рестриктазами позволяет получить фрагменты различной длины. Визуализация результатов методом электрофореза позволяет получить электрофореграммы с изображением длины фрагментов исследуемой последовательности, на основании которых можно установить полиморфизм исследуемого генетического материала.

3.9. Эндонуклеазы рестрикции (рестриктазы)

Эндонуклеазы рестрикции, рестриктазы (от лат. restrictio - ограничение) - группа ферментов, принадлежат к классу гидролаз, катализируют реакцию гидролиза нуклеиновых кислот. Общепринято термины "рестриктаза", "эндонуклеаза рестрикции" и "сайт специфическая эндодезоксирибонуклеаза" считать синонимами. Эти ферменты, впервые открытые как часть системы рестрикции-модификации ДНК у бактерий, специфически гидролизуют молекулы двухцепочечных ДНК при наличии в них определенных последовательностей нуклеотидов, называемых сайтами рестрикции.

Все рестрикционные эндонуклеазы бактерий имеют специфические, довольно короткие последовательности ДНК, и связываются с ними. Этот процесс сопровождается разрезанием молекулы ДНК либо в самом сайте узнавания, либо в каком-то другом, что определяется типом фермента. Наряду с рестрикционной активностью бактериальный штамм обладает способностью метилировать ДНК; для этого процесса характерна такая же специфичность в отношении последовательностей ДНК, как и для рестрикции.

Классификация рестриктаз. По механизму действия и молекулярной структуре различают три типа рестриктаз. Рестриктазы первого типа узнают определённую последовательность нуклеотидов и разрезают двухцепочную молекулу ДНК неподалёку от этой последовательности в произвольной точке, и само место разреза не строго специально. Рестриктазы второго типа узнают определённую последовательность и разрезают двойную спираль ДНК в определённой фиксированной точке внутри этой последовательности. Рестриктазы этого типа узнают полиндромные последовательности, которые обладают центральной осью и считаются одинаково в обе стороны от оси симметрии.

Рестриктазы третьего, промежуточного, типа (например, EcoPI) узнают нужную последовательность и разрезают двухцепочную молекулу ДНК, отступив определённое число нуклеотидных пар от её конца (или в нескольких точках на разном удалении от сайта узнавания). Эти рестриктазы узнают асимметричные сайты.

Номенклатура. Названия рестриктаз складываются из первых букв видовых названий бактерий, в которых они обнаружены, например Eco – *E. coli*. В том случае, когда различные по специфичности действия рестриктазы присутствуют в клетках разных штаммов одного вида бактерий, в название рестриктазы вводят дополнительную букву, например рестриктазы Hinc и Hind выделены из бактериальных клеток *Haemophilus influenzae*, штаммы с и d. Цифры, следующие за буквенными обозначениями, отражают последовательность открытия соответствующих рестриктаз в клетках бактерий одного вида, например HaeI, HaeII и HaeIII из *H. aegypticus*.

Изошизомеры и гетерошизомеры. В клетках разных видов бактерий могут содержаться рестриктазы, узнающие одни и те же сайты рестрикции. Такие рестриктазы называют изошизомерами. Среди изошизомеров имеются ферменты, которые узнают одни и те же последовательности, но разрезают их по-разному. Такие рестриктазы называют гетерошизомерами.

Более шестисот рестриктаз сегодня доступны в виде коммерческих препаратов, и повседневно используются в лабораториях для модификации ДНК и решения различных задач. Рестриктазы являются высокоспецифическими ферментами. Однако для поддержания этой специфичности *in vitro* необходимо соблюдать в реакционной смеси оптимальные условия для действия ферментов. При нарушении таких условий у некоторых рестриктаз начинает проявляться вторичная (так называемая штриховая) активность.

Каждой эндонуклеазе рестрикции компании производители прилагают соответствующий буфер, при использовании которого фермент проявляет 100% своей активности. За единицу активности (е.а.) эндонуклеазы рестрикции принято количество фермента, необходимое для полного гидролиза 1 мкг ДНК за 60 мин в 50 мкл реакционной смеси при оптимальной температуре протекания реакции. Особенности функционирования той или иной эндонуклеазы рестрикции приведены в паспорте фермента.

3.10. Детекция продуктов амплификации

Визуализацию рестриционных ПЦР-фрагментов проводят методом электрофореза в агарозном геле в присутствии бромистого этидия. Бромистый этидий образует с фрагментами ДНК устойчивый комплекс: он внедряется в «стопку» остатков азотистых оснований ДНК, составляющую сердцевину двойной спирали. В результате они оказываются в гидрофобном окружении, в котором бромистый этидий начинает флуоресцировать. В водной среде он этим свойством не обладает. Поэтому ДНК выявляется в виде светящихся полос при облучении геля УФ светом с длиной волны 290–330 нм.

В зависимости от размера образующихся в результате ПЦР-ампликонов используют гель с содержанием агарозы от 1,5% до 2,5%. Для приготовления агарозного геля расплавляют в СВЧ-печи смесь агарозы, буфера и воды, добавляют раствор бромистого этидия. Охлажденную до 50–60°C смесь заливают в форму слоем толщиной 4–6 мм и с помощью специальных гребенок делают в геле карманы для нанесения образца. Гребенки устанавливают таким образом, чтобы между дном лунок и основанием геля оставался слой агарозы 0,5–1 мм. После застывания геля в карманы наносится амплификат в количестве 5–10 мкл. Гель с нанесенными образцами переносят в камеру для электрофореза, заполненную буфером. Камеру

подключают к источнику питания и проводят электрофоретическое разделение продуктов амплификации в течение 30–45 мин при напряженности электрического поля 10–15 В/см.

Рекомендуется параллельно с контрольными и опытными пробами проводить электрофорез смеси маркеров длин фрагментов ДНК. Обычно такая смесь содержит десять фрагментов ДНК длиной 100, 200, 300 и т.д. пар оснований. Постановка такой пробы позволяет определить длину ампликонов в пробах.

3.11. Принцип метода электрофореза

Электрофорез - это метод разделения макромолекул, различающихся по размеру (или молекулярная масса), пространственной конфигурации, вторичной структуре и электрическому заряду. Физический принцип метода заключается в следующем. Макромолекулы, находящиеся в буферном растворе, обладают некоторым суммарным электрическим зарядом, величина и знак которого зависит от рН среды. Если через этот раствор пропустить электрический ток, то вдоль канала установится определенный градиент напряжения, т.е. сформируется электрическое поле. Напряженность электрического поля измеряется разностью потенциалов по концам канала, отнесенной к его длине (В/с). Под действием поля макромолекулы в соответствии со своим суммарным зарядом перемещаются в направлении катода или анода. В зависимости от величины заряда и размеров молекулы приобретают различные скорости. При проведении электрофореза рабочий канал заполняют гелем, наличие сетки которого вносит важную дополнительную деталь в электрофоретическую миграцию молекул.

В настоящее время используют полиакриламидный гель (ПААГ) и агарозный гель. Варьируя концентрацию полимера, можно получать

гели с очень широким диапазоном размеров пор. Кроме того, можно изменять электрические заряды макромолекул путем вариации рН буфера, а их конфигурацию путем введения в буфер денатурирующих агентов или детергентов. Все это придает методу электрофореза исключительную гибкость.

В ходе электрофореза зоны макромолекул остаются невидимыми. Для наблюдения за процессом в исходный препарат добавляют краситель, молекулы которого несут электрический заряд того же знака, что и фракционируемые молекулы, но не взаимодействуют с ними.

Краситель тоже передвигается в электрическом поле, но уже в виде окрашенной зоны. Его подбирают таким образом, чтобы скорость миграции наиболее подвижных макромолекул была несколько ниже, чем у молекул красителя. Когда окрашенная зона доходит до конца трубки, электрофорез прекращают.

Агароза - это особо чистая фракция природного линейного полисахарида агара, который получают из морских красных водорослей (*Gracilaria*, *Gelidium*, *Ahnfeltia*). Агароза состоит из строго чередующихся остатков 3-О- замещенной β -D-галактопиранозы и 4-О- замещенной 3-6-ангидро- α -L-галактопиранозы. Молекулярная масса ее составляет 104-105. Гелеобразование идет путем связывания в пространственную сетку пучков нитей за счет водородных связей между ними. Некоторые виды агарозы образуют прочные гели уже при концентрации 0,3%. При температурах 84-96°C раствор агарозы переходит в прозрачную жидкость – «плавится». Вязкость расплавленного 1%-ного раствора агарозы составляет 10-15 с П, что примерно соответствует вязкости 50%-ного раствора сахарозы при комнатной температуре. Растворы агарозы затвердевают, образуя гель, при температуре 36-42°C. У легкоплавких типов агарозы эта температура снижается до 30°C. Такая особенность

облегчает манипуляции с расплавленной агарозой - можно не опасаться преждевременного ее застывания в гель. Более того, расплавленную агарозу предварительно охлаждают до 50-55°C и уже при этой температуре заливают в формы.

Гели агарозы не вполне прозрачны, что обусловлено «кристаллизацией» геля. Затвердевший гель представляет собой не вполне равновесную систему: со временем он несколько уплотняется, выдавливая из себя жидкость. Температура плавления и гелеобразования зависят от содержания в агарозе метоксильных групп, которое может достигать 3-4%. Наличие этих групп затрудняет гелеобразование. В агарозе неизбежно содержатся и эфиры серной кислоты. Чем

меньше в агарозе заряженных сульфогрупп, тем слабее силы электростатического отталкивания между молекулами полимера и выше их способность к связыванию водородными связями. Их присутствие существенно влияет не только на температуры плавления и застывания гелей, но и на сам процесс электрофореза. В частности, именно эфиры серной кислоты обуславливают сильно выраженное при электрофорезе в гелях агарозы явление эндосмоса, суть которого в следующем: отрицательно заряженные остатки серной кислоты неподвижно связаны с полимерными нитями агарозы. Соответствующие им положительные ионы, находясь в водной фазе под действием электрического поля, мигрируют в направлении катода.

Агароза для электрофореза выпускается обычно в виде лиофилизированного порошка. Для приготовления геля выбранной концентрации навеску порошка растворяют в соответствующем буфере и нагревают до 90-95°C. Выбор концентрации агарозы, т.е. пористости ее геля, зависит от размера макромолекул. Средний размер пор 2%-ного геля агарозы приблизительно соответствует

диаметру сферически упакованной молекулы биополимера с массой 50 млн. дальтон. Гели с более высоким содержанием агарозы используют для гель-фильтрации. При электрофорезе поры геля должны быть легко проницаемы для молекул биополимеров, чтобы лишь тормозить их миграцию в электрическом поле за счет трения, поэтому для электрофореза применяют агарозные гели с концентрацией 0,4-2%.

Современные варианты электрофореза используют пластинки или колонки с агарозным гелем. В зависимости от цели исследований электрофорез в агарозном геле может быть аналитическим и/или препаративным. Аналитический электрофорез в агарозном геле имеет целью электрофоретическое разделение макромолекул с последующей визуализацией и анализом полученных результатов.

Агарозный электрофорез применяют в препаративных целях. Для извлечения из геля разделенных компонентов используют несколько способов: агарозный гель подвергают элюции буферными растворами, центрифугированию, замораживанию и оттаиванию и др.

Для приготовления агарозного геля в СВЧ-печи или на водяной бане расплавляют смесь агарозы, буфера и воды. Охлажденную до 50-60*С смесь тонким слоем заливают в форму и с помощью специальных гребенок делают в геле лунки для нанесения образца. Исследуемый препарат (раствор белка, ДНК или РНК) вносят в лунку, расположенную у края геля - полужидкой среды с сетчатой пространственной структурой (обычно для электрофореза используют тонкие пластины геля). Находящиеся в буферном растворе макромолекулы обладают некоторым суммарным электрическим зарядом, и когда через гель пропускают электрический ток, они перемещаются в электрическом поле. Молекулы одинакового размера (и одинакового заряда) движутся единым фронтом, образуя в геле дискретные невидимые полосы. Чем меньше размер молекул, тем

быстрее они движутся. Постепенно исходный препарат, состоящий из разных макромолекул, разделяется на зоны, распределенные по длине пластинки. За ходом электрофореза следят по перемещению в геле красителя -заряженного низкомолекулярного вещества, которое вносят в каждую лунку перед началом электрофореза. После электрофореза получается набор четких полос, расположенных одна. По интенсивности окраски полос можно судить о концентрации макромолекул в образце. Чтобы определить относительную молекулярную массу разделенных фрагментов, одновременно проводят электрофорез маркерных макромолекул с известными молекулярными массами. Набор маркеров должен охватывать весь диапазон молекулярных масс в данной системе. Образец маркерных молекул вносят в отдельную лунку, расположенную вблизи одного из краев пластинки (или в две лунки у двух разных краев).

Для регистрации продуктов реакции амплификации ДНК используют электрофорез в агарозном геле в присутствии бромистого этидия. Бромистый этидий образует с фрагментами ДНК устойчивое соединение внедрения, проявляющееся в виде светящихся полос при облучении геля УФ-излучением с длиной волны 290-330 нм.

Преимущества агарозного геля в качестве твердого носителя для электрофореза:

- прочность агарозного геля;
- крупнопористость (позволяющая разделять особенно крупные молекулы, в частности нуклеиновые кислоты);
- агарозный гель является очень мягким носителем (т.е. в отличие от электрофореза на бумаге, например, при нем не происходит инактивации белков, что позволяет определять активность отдельных фракций белков после проведения электрофореза);
- приготовление агарозного геля значительно проще, чем крамального и полиакриламидного;

- относительно небольшая продолжительность электрофореза (сильно варьирует в зависимости от варианта метода);
- относительная дешевизна метода.

Таким образом, электрофорез в агарозном геле в различных модификациях широко применяется как метод разделения макромолекул в биологии и медицине.

3.12. Основное оборудование для проведения исследований методом ПЦР и ПЦР-ПДРФ

Основное оборудование, необходимое для проведения молекулярно-генетических исследований методами ПЦР и ПЦР-ПДРФ:

- ПЦР-бокс универсальный;
- ламинарный шкаф 2 класса биологической защиты;
- твердотельный термостат Термит для пробирок объемом 0,5-1,5 мл с диапазоном рабочих температур 25-100 °С;
- настольная центрифуга для микропробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5-2 мл (максимальная скорость вращения 14 500 об/мин);
- микроцентрифуга / вортекс (скорость вращения (постоянная) 2400 об/мин);
- многоканальный амплификатор «Терцик» (с возможностью автономного программирования);
- источник питания (программируемый) (до 400 В);
- камера для горизонтального электрофореза;
- видео-система Gellmager для документации результатов электрофореза;
- программное обеспечение (Россия);
- трансиллюминатор (Viberlourmat, Франция);
- аспиратор с колбой ловушкой FTA-1, Biosan;

- дозатор лабораторный объем до 2,5 мл для растворов (диапазон дозирования, 0,05-2,5 мл);
- дозатор лабораторный объем до 10 мл для растворов (диапазон дозирования, 0,2-10 мл);
- весы лабораторные с точностью взвешивания до 10 мг;
- дозаторы ("Discovery Comfort" (HTL) на 0,5-10, 2-20, 20-200, 100-1000 мкл;
- микроволновая печь для плавления агарозы;
- магнитная мешалка для жидкости небольших объемов (до 2л);
- аквадистиллятор (производительность 4 л/ч (-10%));
- холодильники с видеодисплеем;
- персональные компьютеры с предустановленным специализированным программным обеспечением.

Бокс абактериальной воздушной среды БАВп-01-«Ламинар-С.»-1,2 (221.120) – предназначен для физической изоляции (удержания и контролируемого удаления из рабочей зоны) патогенных биологических агентов (ПБА) и микроорганизмов с целью предотвращения возможности заражения воздушно-капельным путем персонала и контаминации воздуха рабочего помещения и окружающей среды, а также для защиты рабочих агентов внутри рабочей зоны от внешней и перекрёстной контаминации. Бокс не обеспечивает защиту от токсичных химических веществ и радионуклидов, а также не удерживает запахи рабочих агентов.



Рисунок 7. Бокс абактериальной воздушной среды БАВп-01-
«Ламинар-С.»-1,2

Если данный бокс будет использоваться для работы с патогенными биологическими агентами (ПБА) и микроорганизмами высших (особо опасных) групп патогенности, то необходимо обязательно использовать защитный (противочумный) костюм соответствующего типа.

Бокс антибактериальной воздушной среды БАВ-ПЦР-«Ламинар-С.» (620.100) - используется для работы с ДНК пробами при проведении ПЦР-диагностики. Бокс предназначен для защиты от контаминации ДНК-проб при проведении ПЦР-диагностики. Бокс предназначен как для научных исследований, так и для диагностики в практическом здравоохранении и службе госсанэпиднадзора (генотипирование, диагностика инфекционных заболеваний).



Рисунок 8. Бокс антибактериальной воздушной среды БАВ-ПЦР-
«Ламинар-С.»

Микроцентрифуга «МиниСпин» - настольная персональная центрифуга, разработана для работы в учебных и исследовательских лабораториях в области биологии, медицины и химии.



Рисунок 9. Микроцентрифуга «МиниСпин», развивающая
ускорение до 10000 g

Одновременно можно центрифугировать двенадцать микропробирок типа Eppendorf в роторе с фиксированным углом 45°. Настольная персональная центрифуга обеспечивает следующие параметры: относительное центостремительное ускорение – 12-100 g; скорость вращения– 13 400 об/мин.

Мини центрифуга/вортекс «Микроспин» FV-2400 - разработана специально для исследований в области генной инженерии (особенно для ПЦР-диагностики), биохимических, иммунологических и экологических исследований, промышленных биотехнологических лабораторий. Прибор обеспечивает возможность одновременного встряхивания и разделения образцов, используя модули вортексирования и центрифугирования, расположенные на едином спин модуле.



Рисунок 10. Мини центрифуга/вортекс «Микроспин» FV-2400

Термостат твердотельный с таймером ТТ-2 «Термит» - представляет собой твердотельный термостат с таймером и предназначен для научных и клинико-диагностических исследований,

в том числе ПЦР-диагностики. Работа прибора заключается в поддержании заданной температуры матрицы, в гнезда которой установлены пробирки с реакционной смесью. Нагрев матрицы осуществляется керамическими нагревательными элементами, охлаждение – за счет естественного рассеивания тепла. Процесс контролируется микро-ЭВМ.



Рисунок 11. Термостат твердотельный с таймером ТТ-2 «Термит»

Мини-ротатор для вакутайнеров и пробирок «BioRS-24» - осуществляет вертикальное вращение платформы. Ротатор – идеальный инструмент для предотвращения свертывания крови в пробирках, проведения процессов экстракции, диффузии и диализа биологических компонентов. Диапазон регулирования скорости 5-30 об/мин. Цифровая установка времени: 1 мин. – 24 ч/непрерывно. Вертикальное вращение – 360°. .Время непрерывной работы, не более 8 часов. Рекомендуемая нагрузка: макс. объем – 285 мл; макс. вес – 375 г.



Рисунок 12. Миниротатор «BioRS-24» для перемешивания смеси в пробирках

Аспиратор с сосудом-ловушкой «FTA-1» - предназначен для аспирации (удаления) следовых количеств спирта (или буфера) со стенок пробирок Эппендорф при очистке ДНК (РНК) и других технологий переосаждения макромолекул. Прибор также может быть использован для рутинных операций отмыва клеток от питательной среды и ресуспендирования в буфере. Принцип работы аспиратора заключается в создании отрицательного давления в сосуде-ловушке при помощи микрокомпрессора, встроенного в корпус. Сосуд-ловушка соединен силиконовой трубкой с наконечником. Жидкость удаляется из пробирки в сосуд-ловушку при соприкосновении наконечника с поверхностью раствора. Гидрофобный микробиологический фильтр устраняет риск выхода бактерий, вирусов и инфекционных частиц из сосуда-ловушки. Гидрофобный микробиологический фильтр задерживает частицы размером больше 0,027 микрон, с эффективностью до 999,9%.



Рисунок 13. Аспиратор с сосудом-ловушкой «FTA-1»

pH-метр «pH-150МИ» - предназначен для измерения показателя активности ионов водорода (pH), окислительно-восстановительного потенциала (Eh) и температуры (t) водных растворов и непосредственного измерения pH мяса и мясопродуктов.



Рисунок 14. pH-метр «pH-150МИ»

Термостат программируемый для проведения ПЦР-анализа четырехканальный ТП4-ПЦР-01-«Терцик» - амплификатор может проводить достаточно быстро охлаждение и нагревание пробирок (обычно с точностью не менее 0,1 °C).



Рисунок 15. Амплификатор ТП4-ПЦР-01-«Терцик»

Амплификаторы позволяют задавать сложные программы, в том числе с возможностью «горячего старта» и последующего хранения. Обычно при проведении ПЦР выполняется 20-45 циклов, каждый из которых состоит из трех стадий: денатурации, отжига праймеров, элонгации. Прибор представляет собой многоканальный программируемый терморегулятор и предназначен для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) в клиничко-диагностических и научных лабораториях.

Термоциклер «Bio-Rad T100™» – компактное устройство для ПЦР с полным набором функций, необходимых исследователю. Устройство отличается легкостью работы и удобным интерфейсом. Важная особенность прибора – чувствительный сенсорный экран. Технология температурного градиента обеспечивает оптимизацию реакции за один цикл.



Рисунок 16. Термоциклер «Bio RAD T100™»

Легкость оптимизации с помощью уникальной функции – дополнительный фактор высокой производительности прибора. Устройство выполняет стандартную функцию амплификации (ПЦР) нуклеиновых кислот. Термоциклер обеспечивает реализацию всех стандартных исследований в современной генетике: секвенирование, аналитические эксперименты в сфере экспрессии генов, мутационный анализ, клонирование. Прибор отличается простым управлением протоколами с помощью персонифицированных папок или ФЛЭШ-накопителя.

Камера для горизонтального электрофореза «SE-1» - предназначена для электрофореза нуклеиновых кислот в агарозном геле. Устройство для проведения горизонтального электрофореза «SE-1» состоит из корпуса выполненного в виде ванночки со стационарно закрепленными платиновыми электродами, каждый из которых соединен на корпусе камеры со своим разъемом, маркированным цветной накладкой (красной или черной) и съемной прозрачной крышки с закрепленными на ней ответными частями

камерных разъемов. Конструкция крышки обеспечивает автоматическое обесточивание камеры при её снятии.



Рисунок 17. Камера для электрофореза

Положительный вывод блока питания подключается к сетевому разъему, маркированному красным цветом. Отрицательный вывод подключается к разъему маркированному черным цветом. Для удобства пользователей камера укомплектована заливочным устройством, с прижимными винтами и гребенками, а также столиком с уровнем для равномерной заливки геля в гелевой рамке.

Трансиллюминатор «Vilber Lourmat» - прибор предназначен для просмотра гелей в видимом и УФ диапазоне. Особым образом обработанные УФ-фильтры и специальные рефлекторные мембраны внутри трансиллюминатора позволяют создать в области просмотрочного экрана равномерное интенсивное излучение с заданной длиной волны.

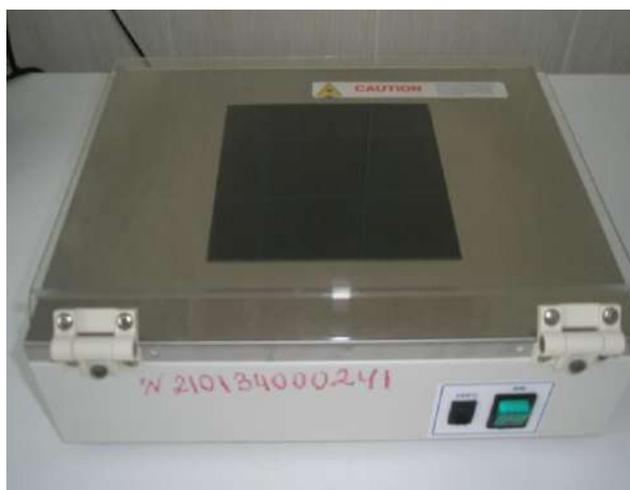


Рисунок 18. Трансиллюминатор «Vilber Lourmat»

Таким образом, качество изображения геля значительно улучшается. Защитный пластиковый экран предохраняет оператора от УФ-излучения. Трансиллюминаторы «Vilber Lourmat» укомплектованы лампами повышенной долговечности, которые в случае необходимости можно менять. Поверхность трансиллюминатора выполнена из нержавеющей стали, устойчивой к химическим и механическим воздействиям, что обеспечивает долговечность прибора.

Видеосистема «GEL-IMAGER 2» - предназначена для ввода в ПЭВМ изображений люминесцирующих следов ДНК в гелях, окрашенных бромидом этидия.

Чувствительность не менее 10 нг ДНК с возможной ручной регулировкой за счет диафрагмы объектива. Размер исследуемого изображения от 90×115 до 170×200 мм с плавным ручным масштабированием. Программное обеспечение, поставляемое в комплекте, позволяет произвести запись черно-белых изображений в файл с возможностью JPEG-компрессии с разрешением до 768×576 пикселей. Продукты реакции амплификации выглядят в виде

светящихся полос, наблюдаемых визуально в УФ-свете трансиллюминатора.



Рисунок 19. Видеосистема «GEL-IMAGER 2»

Результаты фиксируют посредством фотографирования или видеосъемки геля при использовании УФ-фильтров. Специфичность полосы амплифицированной ДНК подтверждается ее положением (размерами) по отношению к маркерным фрагментам и ДНК стандарту.

Магнитная мешалка «MS-300» - предназначена для эффективного перемешивания жидкостей различной степени вязкости. Прибор обеспечивает перемешивание жидкости со скоростью вращения магнитного элемента до 3000 об/мин (максимальная скорость зависит от размеров перемешивающего элемента, объема и вязкости жидкости, формы сосуда и т.п.).



Рисунок 20. Магнитная мешалка «MS-300»

Весы электронные ScoutPro – помимо простого взвешивания, могут использоваться в режимах счета штуке автоматической оптимизацией, сохранения максимального значения веса, суммирования, процентного взвешивания и определения плотности образцов. Предел взвешивания (НПВ) от 120г до 6000 г.



Рисунок 21. Весы электронные «ScoutPro»

Контрольные вопросы:

- 1) Биологический смысл ДНК.
- 2) Понятие ДНК-маркеров селекционных признаков.
- 3) Понятие о маркере.
- 4) Понятие о генах-кандидатах.
- 5) Преимущества селекции по маркерам.
- 6) Порядок сбора и подготовки исследуемых образцов.
- 7) Основные этапы выделения ДНК.
- 8) Суть метода ПЦР. Режимы амплификации.
- 9) Суть метода ПЦР-ПДРФ.
- 10) Применение эндонуклеаз рестрикции. Классификация рестриктаз.
- 11) Детекция продуктов ПЦР. Суть метода электрофореза в агарозном геле.
- 12) Требования к помещениям для ДНК-диагностики.
- 13) Основные виды оборудования для ДНК-диагностики.

4. ЛАБОРАТОРНЫЙ ПРАКТИКУМ

Все работы проводятся в специально оборудованной лаборатории. Допуск в лабораторию к занятиям разрешается только после знакомства с инструкцией по технике безопасности и вводного инструктажа. Все работы проводятся только в присутствии сотрудников лаборатории.

Для снижения риска контаминации помещения в лаборатории разделены на рабочие зоны. Работа с биологическими объектами на стадиях выделения ДНК, приготовления ПЦР-смесей и анализа амплифицированной ДНК должна проводиться в разных рабочих зонах. Комплект лабораторного оборудования закреплен за каждой рабочей зоны.

Помещения в ПЦР-лаборатории разделены на четыре зоны:

1. Зона приема, регистрации, разбора и первичной обработки материала.
2. Зона выделения нуклеиновых кислот.
3. Зона приготовления реакционных смесей и проведения ПЦР.
4. Зона детекции продуктов амплификации.

Зона приема, регистрации, разбора и первичной обработки материала: проводят прием, пробоподготовку (сортировку, маркировку, центрифугирование и др.), хранение и первичную инактивацию остатков биоматериала дезинфицирующими средствами. Зона приема, регистрации, разбора и первичной обработки материала располагается в комнате №1.

Зона выделения нуклеиновых кислот размещается в отдельном помещении, комнате №2. В рабочей зоне расположен бокс биологической безопасности II класса защиты для выделения НК. Проведение других видов работ в боксе не допускается.

Зона приготовления реакционных смесей и проведения ПЦР
– комната №3: Приготовление реакционных ПЦР-смесей проводят в ПЦР-боксе.

Зона детекции продуктов амплификации комната №4 располагается в отдельном помещении, на другом этаже.

Планировочные решения и размещение оборудования обеспечивают поточность движения исследуемого материала и полностью исключают воздухообмен между помещением детекции продуктов амплификации (№4) и другими помещениями (№1, 2, 3).

Перед занятиями необходимо заранее ознакомиться с ходом проведения опытов по учебному пособию, отчетливо уяснить цели и задачи работы. Выполнение лабораторной работы и каждого отдельного опыта требует строгого соблюдения всех указаний, содержащихся в описании работы. Опыт должен исполняться тщательно, аккуратно и без спешки. Если работа не может быть закончена в течение одного занятия, то необходимо заранее обсудить, на каком этапе работа должна быть прервана.

4.1. Лабораторная работа №1

Выделение ДНК с помощью набора DIAtom™ DNAPrep

Цель работы: научиться выделять ДНК из образцов тканей сельскохозяйственных животных с помощью коммерческого набора DIAtom™ DNAPrep (ООО «НПФ Генлаб»).

Оборудование и материалы

Работа проводится в зоне выделения нуклеиновых кислот

Оборудование: термостат, поддерживающий температуру $65 \pm 2^\circ\text{C}$; микроцентрифуга, развивающая ускорение до 10000 g; вортекс, ротатор, дозаторы на 1000, 200, 10 мкл; цилиндр мерный на 200-500 мл; штатив для пробирок.

Расходные материалы: одноразовые наконечники (на 1000, 200, 10 мкл), пластиковые пробирки 1,5 мл, перчатки резиновые или латексные, неопудренные.

Реактивы:

Lysis reagent (Лизирующий раствор), 1 флакон, 60 мл; Saline buffer (Солевой), 10-кратный буфер, 1 флакон, 5 мл; NucleoS™ (Суспензия сорбента), 2 пробирки по 1 мл; ExtraGen (Экстра Ген, суспензия смеси ионообменников), 1 флакон, 10 мл; спирт этиловый 96%, вода дистиллированная.

Биологический материал: выщип ткани (свиней, КРС, овец).

Ход работы

Для снижения риска кросс-контаминации все манипуляции производить только в перчатках! Наконечники для автоматического дозатора необходимо использовать однократно.

Выделение ДНК

Набор реагентов DIAtom™DNAPrep100 основан на использовании лизирующего реагента с гуанидинтиоционатом, который предназначен для лизиса клеток, солюбилизации клеточного дебриса, а также для денатурации клеточных нуклеаз. В присутствии Лизирующего реагента ДНК активно сорбируется на NucleoS-сорбенте, затем легко отмывается от белков и солей спиртовым раствором. ДНК, элюированная из сорбента ЭкстраГеном™ или чистой водой, может быть напрямую использована по назначению.

Этапы работы

Приготовление рабочего раствора Солевого буфера

Содержимое флакона с 10-кратным Солевым буфером, 5 мл, перенести в мерный цилиндр, довести бидистиллированной водой до метки 50 мл и 96% этиловым спиртом до метки 150 мл и перемешать. Готовый рабочий раствор Солевого буфера следует хранить в герметично закрытой посуде при температуре 4°C.

1. Подготовить пробирки в соответствии с количеством исследуемых образцов. Пробирки промаркировать в соответствии с номерами образцов. В каждую пробирку внести соответствующий образец площадью 1 мм², добавить 400 мкл Лизирующего реагента, и перемешать содержимое пробирки переворачиванием (5-10 раз). Интенсивное встряхивание смеси не рекомендуется.
2. Термостатировать пробирки 2 часа при температуре 65°C.
3. Подготовить чистые пробирки, промаркировать в соответствии с образцами. В каждую пробирку внести 20 мкл суспензии сорбента NucleoS™ (перед использованием NucleoS™ следует интенсивно встряхнуть на вортексе).
4. После термостатирования пробирки со смесью центрифугировать 10 сек при 5000g и перенести прозрачный супернатант в пробирки с суспензией сорбента NucleoS™.
5. Пробирки поместить на ротатор и перемешивать 10 мин (10-20 об/мин).
6. Центрифугировать 10 сек при 5000 g.
7. Осторожно слить супернатант, следя за тем, чтобы осадок остался в пробирке.
8. К осадку добавить 200 мкл Лизирующего реагента, тщательно перемешать на вортексе до полного гомогенного состояния.
9. Добавить в пробирку 0,5 мл рабочего раствора Солевого буфера.
10. Перемешать содержимое пробирки переворачиванием пробирки 5-10р.
11. Центрифугировать 10 сек при 5000 g.
12. Осторожно слить супернатант, следя за тем, чтобы осадок остался в пробирке.

13. Добавить в пробирку 0,5 мл Солевого буфера, перемешать содержимое пробирки на вортексе, центрифугировать 10 сек при 5000 g и осторожно слить супернатант.
14. Повторить положение 13.
15. Подсушить осадок при температуре 65°C в течение 4-5 мин.
16. Внести 60 мкл ЭкстраГена™.
17. Перемешать содержимое пробирок на вортексе 5-10 сек до получения гомогенной суспензии, потом термостатировать 4-5 мин при 65°C.
18. Еще раз перемешать содержимое пробирок на вортексе перед центрифугированием.
19. Центрифугировать 1 мин при 10000 g.
20. Перенести супернатант с ДНК в чистые, промаркированные пробирки. Пробирки с раствором ДНК поставить в холодильник, при необходимости длительного хранения поместить в морозильную камеру.

4.2. Лабораторная работа №2

Выделение ДНК с помощью набора ДНК-Экстран-2

Цель работы: научиться выделять ДНК из цельной крови с помощью коммерческого набора ДНК-Экстран-2.

Оборудование и материалы

Работа проводится в зоне выделения нуклеиновых кислот.

Оборудование: термостат, поддерживающий температуру 65±2°C, микроцентрифуга, развивающая ускорение до 10000 g; вортекс, ротатор; дозаторы на 1000, 200, 10 мкл; цилиндр мерный на 200-500 мл; штатив для пробирок.

Расходные материалы: одноразовые наконечники (на 1000, 200, 10 мкл), пластиковые пробирки 1,5 мл, перчатки резиновые или латексные, неопудренные.

Реактивы:

Протеиназа К (Реагент для лизиса клеток) 1,0 мл, 1 флакон;
Лизирующий раствор 2 (Реагент для лизиса клеток), 31 мл, 1 флакон;
Осаждающий раствор 1 (Реагент для осаждения белков), 11мл, 1 флакон;
Осаждающий раствор 2 (Реагент для осаждения ДНК), 31 мл, 1 флакон;
Промывочный раствор (Реагент для промывки ДНК), 41 мл, 1 флакон;
Элюирующий раствор (Реагент для растворения ДНК), 11 мл, 1 флакон;
2-Меркаптэтанол (Реагент для лизиса клеток), 0,2 мл, 1 флакон;
Гликоген (Реагент для соосаждения ДНК), 0,2 мл, 1 флакон;
спирт этиловый, 96%; вода дистиллированная.

Биологический материал: цельная кровь животного (свиней, КРС, овец).

Ход работы:

Для снижения риска кросс-контаминации все манипуляции производят в перчатках. Наконечники для автоматического дозатора необходимо использовать однократно.

Подготовка реактивов:

Лизирующий раствор 2 (если есть осадок) прогреть на термостате при 60°C, или выдержать при комнатной температуре 15-30 минут и обязательно перемешать плавным переворачиванием до полного растворения осадка.

Выделение ДНК

Этапы работы:

1. Внесение образца

1.1. Промаркировать необходимое количество пробирок объемом 1,5 мл в соответствии с количеством анализируемых проб. Во все пробирки внести 100 мкл крови.

2. Лизис клеток

При выделении большого количества образцов компоненты (№1, №2, №7) смешать заранее в отдельной пробирке.

2.1. В каждую пробирку внести по 280 мкл Лизирующего раствора 2 (№2) и 1 мкл 2-меркаптэтанолола (№7).

2.2. Внести в пробирки по 10 мкл раствора Протеиназы К (№1) и перемешать на вортексе.

2.3. Оставить на ночь при температуре 56 °С.

3. Осаждение белков

3.1. К лизату добавить 100 мкл Осаждающего раствора 1 (№3). Перемешать содержимое пробирок на вортексе 20 секунд.

3.2. Центрифугировать смесь 5 минут при 13 000 об./мин. На дне пробирки должен образовываться плотный осадок. Если осадок недостаточно плотный, охладить пробирки на льду 1-2 мин и снова центрифугировать.

4. Осаждение ДНК

4.1. В чистые промаркированные пробирки 1,5 мл внести по 2 мкл соосадителя ДНК (№8).

4.2. Супернатант, содержащий ДНК, перенести в полном объеме в пробирки с соосадителем ДНК.

4.3. Добавить 300 мкл Осаждающего раствора 2 (№4) и перемешать переворачиванием (10-12 раз) до появления видимого осадка ДНК.

4.4. Центрифугировать смесь при 13 000 об/мин. 5 мин. Осторожно слить супернатант и промокнуть пробирки на фильтровальной бумаге.

5. Промывка и растворение ДНК

5.1. Добавить 400 мкл Промывочного раствора (№5) и перемешать несколько раз переворачиванием для промывки ДНК.

5.2. Центрифугировать 2 мин при 13 000 об/мин. Осторожно удалить супернатант и промокнуть пробирки на фильтровальной бумаге.

5.3. Открытые пробирки подсушить на воздухе или в термостате при 37°C 10-15 мин до полного испарения спирта.

5.4. Добавить к осадку 50 мкл Элюирующего раствора (№6). Перемешать и прогреть при 65°C 5 мин до растворения ДНК.

5.5. Полученный раствор ДНК хранить при -20°C. Допустимо кратковременное хранение раствора ДНК при +4°C.

4.3. Лабораторная работа №3

Выделение ДНК на колонках «К-СОРБ-100»

Цель работы: научиться выделять ДНК из образцов сырого мяса на колонках «К-СОРБ-100».

Оборудование и материалы

Работа проводится в зоне выделения нуклеиновых кислот

Оборудование: термостат, поддерживающий температуру 65±2°C, микроцентрифуга, развивающая ускорение до 10000 g; вортекс, ротатор, дозаторы на 1000, 200, 10 мкл; цилиндр мерный на 200-500 мл; штатив для пробирок.

Расходные материалы: одноразовые наконечники (на 1000, 200, 10 мкл), пластиковые пробирки 1,5 мл, перчатки резиновые или латексные, неопудренные.

Реактивы:

Протеиназа К (10 мг/мл), 1,0 мл; Лизирующий раствор, 21 мл; Осаждающий раствор, 21 мл; Промывочный раствор-1, 42 мл; Промывочный раствор-2, 61 мл; Элюирующий раствор, 21 мл; Колонки, 50 шт; спирт этиловый 96%, вода дистиллированная.

Биологический материал: кусочки сырого мяса весом около 5 мг (свиней, КРС, овец).

Ход работы:

Для снижения риска кросс-контаминации все манипуляции производить только в перчатках. Наконечники для автоматического дозатора необходимо использовать однократно.

Выделение ДНК

Этапы работы:

1. Внесение образца.
 - 1.1. Промаркировать необходимое количество пробирок объемом 1,5 мл в соответствии с количеством анализируемых проб. Во все пробирки внести по 5 мг исследуемого материала.
2. Лизис
 - 2.1. Во все пробирки внести 10 мл Протеиназы К (№1) и 200 мкл Лизирующего раствора (№2). Перемешать содержимое на вортексе.
 - 2.2. Смесь инкубировать при температуре 65°C в течение 15 мин. периодически перемешивая содержимое пробирок.
3. Осаждение ДНК.
 - 3.1. Сбросить капли с крышки пробирки краткосрочным центрифугированием и добавить 200 мкл осаждающего раствора (№3). Перемешать содержимое пробирок на вортексе.
 - 3.2. Сбросить капли с крышки краткосрочным центрифугированием и перенести весь раствор из пробирки на колонку (№7), которые необходимо предварительно промаркировать.
 - 3.3. Центрифугировать 1 мин при 8000 об/мин. Удалить жидкость из коллектора колонки. Для этого: аккуратно извлечь колонку из коллектора, затем вернуть колонку в коллектор.
4. Промывка и элюция ДНК.

Нанести на колонку 400 мкл промывочного раствора 1 (№4).

 - 4.1. Центрифугировать 1 мин при 8000 об/мин. Удалить жидкость из коллектора колонки.

4.2. Нанести на колонку 400 мкл промывочного раствора 2 (№5). Центрифугировать при 800 об/мин. в течение 2 мин. Удалить жидкость из коллектора колонки.

4.3. Нанести на колонку 200 мкл промывочного раствора 2 (№5). Центрифугировать при 13000 об/мин в течение 2 мин. Осторожно перенести колонки в чистые промаркированные пробирки.

4.4. Добавить в пробирки 100 мкл Элюирующего раствора (№6), предварительно прогретого до температуры 70°C. Инкубировать 2 минуты.

4.5. Центрифугировать 1 мин при 8000 об/мин. Полученный раствор ДНК хранить при -20°C. Допустимо кратковременное хранение раствора ДНК +4°C.

4.4. Лабораторная работа №4

Постановка полимеразной цепной реакции

Цель работы: Ознакомиться с методикой проведения ПЦР.

Оборудование и материалы

Работа проводится в ПЦР-боксе в зоне приготовления реакционных смесей и проведения ПЦР

Оборудование: ПЦР-амплификатор, вортекс, дозаторы на 1000, 200, 10 мкл; штатив для пробирок.

Расходные материалы: одноразовые наконечники (на 1000, 200, 10 мкл), пластиковые тонкостенные пробирки, перчатки резиновые или латексные, неопудренные.

Реактивы:

Праймеры (прямой и обратный), смесь dNTP , 10X Taq буфер - оптимизированный для амплификации ДНК в стандартных условиях, Taq ДНК-полимераза; вода деионизованная, минеральное масло.

Биологический материал: раствор ДНК сельскохозяйственных животных (свиней, КРС, овец). Обязательно включать в эксперимент

отрицательный контроль, используя стерильную воду вместо ДНК-матрицы.

Ход работы:

Подготовка реакционной смеси

Подготовка реакционной смеси в конечном объеме 20 мкл (1 проба):

- ПЦР-буфер – 5 мкл;
- смесь dNTP – 1 мкл;
- праймеры (прямой и обратный) – по 0,5 мкл каждого;
- Taq ДНК-полимераза – 0,3 мкл;
- вода деионизованная – 12,7 мкл

При одновременной постановке нескольких образцов рекомендуется приготовление общей реакционной смеси. *При расчете количества образцов необходимо к анализируемому количеству образцов добавлять один контрольный и один дополнительный (с учетом погрешности дозаторов и т.д.).*

Пример расчета реакционной смеси на 8 образцов:

- 1) $8+1+1=10$ (общее количество образцов)
- 2) $5 \times 10=50$ мкл (ПЦР-буфер)
- 3) $1 \text{ мкл} \times 10 = 10$ мкл – (смесь dNTP)
- 4) $0,5 \times 10 = 5$ мкл (праймер (прямой и обратный))
- 5) $0,3 \times 10 = 3$ мкл (Taq ДНК-полимераза)
- 6) $12,7 \times 10 = 127$ мкл (вода деионизованная)

Этапы работы

1. Извлекают из пакета необходимое количество пробирок на 0,5 мл и маркируют.

2. Добавляют в пустые пробирки по 5 мкл пробы соответствующей ДНК-матрицы исследуемого образца.

3. В отдельной пробирке готовят реакционную смесь:

Внимание! Фермент (*Taq* ДНК-полимераза) добавлять последним, сразу убрать в морозильную камеру (на – 20°C)!

4. В каждую пробирку с ДНК-матрицей добавить по 20мкл реакционной смеси. Содержимое пробирок перемешивают, встряхивая на вортексе. Центрифугируют 15 с. Отдельные капли ПЦР-смеси, оказавшиеся при ее перемешивании на стенках и крышке пробирки, должны быть сброшены на дно.

5. Во все пробирки добавляют по 10-15 мкл (две капли) минерального масла, пробирки плотно закрывают крышечками.

6. Помещают пробирки в амплификатор и запустить режим ПЦР. (Предварительно настроить программу в соответствии с протоколом проведения ПЦР для амплификации исследуемого фрагмента).

7. По окончании ПЦР пробирки извлекают из амплификатора, помещают в штатив и переносят зону детекции продуктов амплификации. ПЦР-продукты (ампликоны) можно хранить в течение 1-2 недели при - 18°C.

8. Детекцию результатов ПЦР производят с помощью электрофореза в агарозном геле.

9. Полученные результаты регистрируют с помощью видеосистемы.

4.5. Лабораторная работа №5

Рестрикция ПЦР-фрагмента ДНК

Цель работы: Ознакомиться с методикой проведения рестрикции ПЦР-фрагмента.

Оборудование и материалы

Работа проводится в зоне приготовления реакционных смесей и проведения ПЦР

Оборудование: вортекс, термостат, дозаторы на 1000, 200, 10 мкл, штатив для пробирок.

Расходные материалы: одноразовые наконечники (на 1000, 200, 10 мкл), пластиковые тонкостенные пробирки, перчатки резиновые или латексные, неопудренные.

Реактивы:

Эндонуклеаза рестрикции, рестрикционный буфер (X 10), БСА, очищенная вода, минеральное масло.

Биологический материал: ПЦР-фрагмент ДНК (смесь ПЦР). Обязательно включать в эксперимент отрицательный контроль, используя стерильную воду вместо смеси ПЦР.

Ход работы:

Подготовка реакционной смеси (стандартный протокол)

Подготовка реакционной смеси в конечном объеме 10 мкл (1 проба):

- рестрикционный буфер (X 10) - 2 мкл;
- эндонуклеаза рестрикции - 0,5-2 мкл (2-3 е.а.);
- БСА (бычий сывороточный альбумин) - 0,2 мкл (добавляют при необходимости);
- очищенная вода - до конечного объема 10 мкл.

При одновременной постановке нескольких образцов рекомендуется приготовление общей реакционной смеси. *При расчете количества образцов необходимо к анализируемому количеству образцов добавлять один контрольный и один дополнительный (с учетом погрешности дозаторов и т.д.).*

Пример расчета реакционной смеси на 8 образцов:

- 1) $8+1+1=10$ (общее количество образцов)
- 2) $2 \times 10=20$ мкл (рестрикционный буфер)
- 3) $0,2 \times 10 = 2$ мкл (БСА)
- 4) $7,3 \times 10 = 73$ мкл (вода деионизованная)
- 5) $0,5 \times 10 = 5$ мкл (эндонуклеаза рестрикции)

Большинство эндонуклеаз рестрикции необходимо хранить при температуре -20°C , но для некоторых ферментов при длительном хранении рекомендуемая температура составляет -70°C или -80°C . Буферы и БСА необходимо хранить при -20°C , не следует добавлять БСА в буферный раствор и замораживать (есть риск выпадения БСА в осадок).

За единицу активности принимается количество фермента, необходимое для гидролиза 1 мкг ДНК фага лямбда за 1 час при оптимальной температуре в 50 мкл реакционной смеси. Единицы активности, оптимальная температура гидролиза и рекомендуемый буфер указаны изготовителем в паспорте фермента.

Этапы работы

ПЦР фрагмент ДНК - 5 мкл реакционной смеси ПЦР (0,1 до 0,5 мкг);

1. Извлекают из пакета необходимое количество пробирок на 0,5 мл и маркируют.

2. В отдельной пробирке готовят реакционную смесь. После добавления фермента смесь перемешивают, слегка пощелкивая пальцем по пробирке, и кратковременно центрифугируют.

Внимание! Вне морозильной камеры фермент держат на льду и добавляют в реакционную смесь в последнюю очередь! Не надо перемешивать смесь при помощи вортекса.

3. Добавляют в пустые пробирки по 10 мкл реакционной смеси.

4. В каждую пробирку с реакционной смесью добавить по 5 мкл реакционной смеси ПЦР (ПЦР фрагмент ДНК (0,1 до 0,5 мкг)). Содержимое пробирок перемешивают и центрифугируют 15 с. Отдельные капли смеси, оказавшиеся при ее перемешивании на стенках и крышке пробирки, должны быть сброшены на дно.

5. Во все пробирки добавляют по 10-15 мкл (две капли) минерального масла, пробирки плотно закрывают крышечками.

6. Помещают пробирки в термостат и инкубируют в течение 1 часа при оптимальной для фермента температуре. В случае необходимости время инкубации может быть увеличено до 4-16 часов.

7. По окончании времени пробирки извлекают из термостата, помещают в штатив и переносят зону детекции продуктов амплификации. ПЦР-ПДРФ продукты (рестрикты) можно хранить в течение 1-2 недель при - 4°С.

8. Детекцию результатов ПЦР производят с помощью электрофореза в агарозном геле.

9. Полученные результаты регистрируют с помощью видеосистемы.

4.6. Лабораторная работа №6

Гель-электрофорез ДНК

Цель работы: Ознакомиться с методикой проведения электрофореза в агарозном геле.

Оборудование и материалы

Оборудование:

1. Ламинар типа «ПЦР-бокс»
2. Трансиллюминатор (Рисунок 23)
3. Камера для электрофореза
4. Видео-система Gellmager для документации результатов электрофореза, программное обеспечение
5. Источник питания (программируемый) «ЭЛЬФ-4»
6. Дозаторы HTL «VE-series»
7. Штатив для дозаторов
8. Штатив рабочее место 200X0,5мл.

Расходные материалы: одноразовые наконечники (на 1000, 200, 10 мкл), пластиковые тонкостенные пробирки, перчатки резиновые или латексные, неопудренные.

Реактивы:

1. 10 x буфер трис-борат-ЭДТА (ТБЭ): 0,9 М основной трис, 0,9 М борная кислота, 20 мМ ЭДТА. рН доводят до 8,1—8,2 сухой борной кислотой

2. Агароза (для электрофореза)

3. Бромистый этидий EtBr: 10 мг/мл в стерильной дистиллированной воде

4. 6x буфер для нанесения: 0,25% бромфеноловый синий, 40% (в/о) сахараза в 1x ТБЭ.

Биологический материал: фрагмент ПЦР-ПДРФ (подготовленный на предыдущем этапе, см. л/р №5).

Реактивы комплекта содержат токсичный компонент бромистый этидий. Все работы с комплектом реагентов необходимо проводить в резиновых перчатках и халате!

Ход работы:

1. Приготовить 1 x ТБЭ в объеме, достаточном для заполнения камеры для электрофореза и приготовления геля.

2. Добавить к 1 x ТБЭ агарозу в количестве, необходимом для получения 0,35—0,45% (в/о) раствора, и нагреть в микроволновой печи до полного расплавления агарозы.

3. Охладить смесь до +/- 50 °С.

4. Добавить к раствору остывшей агарозы 5 мкл бромистого этидия и осторожно перемешать, избегая появления в геле пузырьков воздуха.

5. Теплую агарозу вылить в кювету для геля и равномерно распределить по кювете. Вертикально вставить гребенку так, чтобы ее зубцы не доставали до дна примерно 1,5 мм.

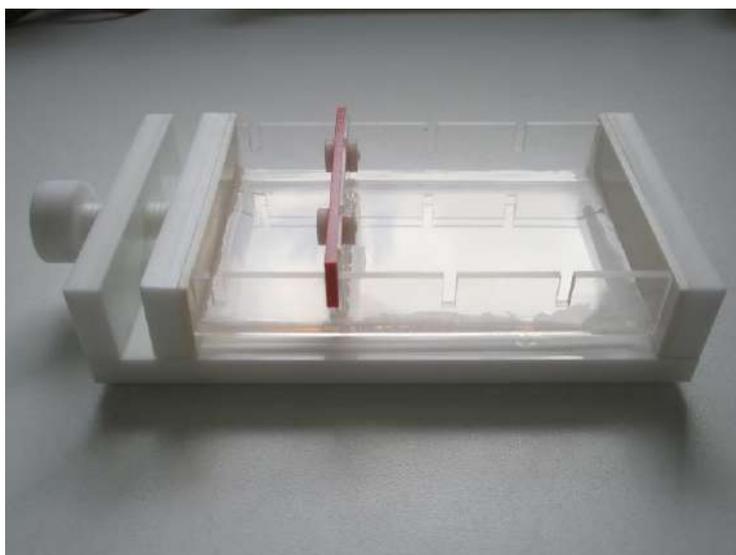


Рисунок 22. Кювета с агарозным гелем и гребенкой

6. Оставить кювету с агарозным гелем на 10-20 мин, затем осторожно удалить гребенку. Поместить пластину с агарозным гелем в камеру для электрофореза. Буфер для электрофореза должен покрывать пластину с гелем слоем приблизительно в 5 мм.

При работе с агарозным гелем следует обязательно надевать резиновые перчатки!

7. Внесите по 7 мкл продукта амплификации в соответствующие лунки агарозного геля под буфера. Для повышения точности определения размера фрагмента маркерную ДНК наносят с краю или по обе стороны от исследуемой ДНК.

Примечание: при нанесении продукта амплификации допускается использование одного наконечника, в этом случае необходимо промывать наконечник водой после нанесения каждого образца (путем многократного пипетирования воды). При анализе продуктов ПЦР из пробирок, запечатанных парафином, рекомендуется использовать пипетки для наконечников с поршнем.

8. Установить крышку на камеру для электрофореза и подключить источник постоянного тока. Электрофорез проводить при напряжении 20 В/см геля в течение 40-90 мин. (при ширине камеры 10

см напряжение, устанавливаемое в источнике постоянного тока, должно быть приблизительно равно 200 В).

9. После окончания электрофореза отключить источник постоянного тока, снять крышку с камеры. В резиновых перчатках вынуть пластину с агарозным гелем из камеры для электрофореза, снять гель с пластины и поместить на экран трансиллюминатора. Включить трансиллюминатор.

10. Учет результатов ПЦР-амплификации ДНК проводить согласно инструкции к комплекту реагентов для ПЦР-амплификации ДНК (рисунок).



Рисунок 23. Детекция гель-электрофорез. Гелевые карманы расположены внизу. 1,2,3 один и тот же образец, но разное количество выделенной ДНК. 1- большое количество ДНК. 3-мало выделенной ДНК.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гетманцева, Л.В. Практическое использование полиморфизма гена MC4R в селекционной работе : научно-практические рекомендации / Л.В. Гетманцева, О.Л. Третьякова, М.А. Леонова. – Персиановский : Донской ГАУ, 2015. - 33 с.
2. Методика формирования лаборатории молекулярно-генетических исследований сельскохозяйственных животных : научно-методическое пособие / Л.В. Гетманцева [и др.] ; Донской ГАУ. – Персиановский : Донской ГАУ, 2015. - 32 с.
3. Взаимосвязь полиморфизма гена LIF/DRAIII с продуктивными качествами свиней / Л.В. Гетманцева [и др.] // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. - 2014. - № 3. - С. 36-39.
4. Жимулев, И. Ф. Общая и молекулярная генетика : учебное пособие / И.Ф. Жимулев ; под ред. Е.С. Беляева, А.П. Акифьева. - 4-е изд., стер. - Новосибирск : Сиб. унив., 2007. - 479 с.
5. Оценка силы статистического влияния полиморфизма гена ESR1 на воспроизводительные признаки свиней / А.Ю. Колосов [и др.] // Аграрный вестник Урала. - 2016. - № 2 (144). - С. 17-19.
6. Интенсификация селекционного процесса в животноводстве с использованием метода ПЦР / М.А. Леонова [и др.] // Молодой ученый. - 2014. - № 11. - С. 172-175.
7. Разработка современных методов селекции свиней в ЗАО «Племзавод-Юбилейный» / С.Н. Мамонтов [и др.] // Свиноводство. - 2015. - № 5. - С. 35-37.
8. Методики клинических лабораторных исследований : справочное пособие. В 3 т. Т. 3. Клиническая микробиология, бактериологические исследования, микологические исследования, паразитологические исследования, инфекционная иммунодиагностика, молекулярная диагностика инфекционных

заболеваний / под ред. В.В. Меньшикова. – Москва : Лабора, 2009. – 880 с.

9. Щелкунов, С.Н. Генетическая инженерия : учеб.-справ. изд-во / С. Н. Щелкунов. - 3-е изд., испр. и доп. - Новосибирск : Сиб. унив. изд-во, 2008. - 514 с.

10. Boom R., Sol C. J. A., Salimans M. M. M., Jansen C. L., Wertheim-Van Dillen P. M. E., Van Der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids // J. Clin. Microb. - 1990. - V. 28, - № 3. – P. 495–503.

11. Karagodina N., Kolosov Y., Bakoev S., Kolosov A., Leonova M., Shirokova N., Svyatogorova A., Getmantseva L., Usatov A. Influence of various bio-stimulants on the biochemical and hematological parameters in porcine blood plasma // J. World Applied Sciences. - 2014. - T. 30, № 6. - P. 723-726.

Учебное издание

Гетманцева Любовь Владимировна

Клименко Александр Иванович

Василенко Вячеслав Николаевич

Колосова Мария Анатольевна

Бакоев Некруз Фарходович

**Молекулярно-генетические исследования сельскохозяйственных
животных методом ПЦР-ПДРФ**

Учебное пособие

Издательство Донского государственного аграрного университета
346493, Россия, пос. Персиановский, Октябрьский район, Ростовская
обл.

Печать оперативная Усл. печат л.10,25 Заказ № Тираж 100 экз.

