

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Национальный исследовательский Томский политехнический университет
Национальный исследовательский Томский государственный университет
Томский государственный архитектурно-строительный университет
Томский государственный университет систем управления и радиоэлектроники

ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ НАУК

Сборник научных трудов
XII Международной конференция студентов и молодых ученых

21–24 апреля 2015 г.

PROSPECTS OF FUNDAMENTAL SCIENCES DEVELOPMENT

XII International Conference of students and young scientists

21–24 April, 2015

Томск 2015

УДК 50(063)
ББК 20л0
П27

Перспективы развития фундаментальных наук [Электронный П27 ресурс] : сборник трудов XII Международной конференция студентов и молодых ученых (Томск, 21–24 апреля 2015 г.) / Томский политехнический университет. – Томск : Изд-во Томского политехнического университета, 2015. – 1556 с.

ISBN 978-5-4387-0560-4

Сборник содержит труды участников XII Международной конференции студентов и молодых учёных «Перспективы развития фундаментальных наук». Включает доклады студентов и молодых ученых, представленные на секциях «Физика», «Химия», «Математика», «Биология и медицина», «Наноматериалы и нанотехнологии», «Технология», «Конкурс архитектурных работ», «IT-технологии и электроника».

Предназначен для студентов, аспирантов, молодых ученых, преподавателей в области естественных наук и высшей математики.

УДК 50(063)
ББК 20л0

Редакционная коллегия

И.А. Курзина, доктор физико-математических наук, доцент ТПУ.

Г.А. Воронова, кандидат химических наук, доцент ТПУ.

С.А. Поробова, инженер ТГАСУ.

ISBN 978-5-4387-0560-4

© ФГАОУ ВО НИ ТПУ,
электронный текст, 2015

ОПТИМИЗАЦИЯ ПЦР ДЛЯ МЕТОДА INTER SIMPLE SEQUENCE REPEAT (ISSR)

Е.Ж. Баяхметов, П.Д. Гудкова

Национальный исследовательский Томский государственный университет,

Россия, г.Томск, пр. Ленина, 36, 634050

E-mail: eugenebavahmetov@gmail.com

PCR OPTIMIZATION FOR INTER SIMPLE SEQUENCE REPEAT (ISSR) METHOD

E.Z. Bavahmetov, P.D. Gudkova

Tomsk State University, Russia, Tomsk, Lenin str., 36, 634050

E-mail: eugenebavahmetov@gmail.com

***Annotation.** PCR optimization for ISSR primers is a key factor to obtain accurate and reproducible results for gene mapping, studying the genetic structure of populations, plant passporting, phylogenetic analysis. Changing temperature conditions, the amount of amplification cycles and concentration of reaction mixture components is allowed to vary the number of bands obtained by this method. This article shows how to adjust the profile of DNA ISSR-fragments by PCR for genus *Stipa L.**

Метод ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) известен уже более 20 лет [1, 2]. Наряду с технологиями RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) [3], SSR (Simple Sequence Repeats) [4] и AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) [5], ISSR позволяет анализировать полиморфизм генома. При этом маркеры, основанные на межмикросателлитных последовательностях, обладают рядом преимуществ – простота использования, низкая стоимость и небольшое количество исходного генетического материала для амплификации, а также более высокая воспроизводимость и специфичность [6, 7, 8].

Установлено, что все виды микросателлит (от моно до гексануклеотидных повторов) находятся в большом количестве в некодирующих областях растений, животных и других эукариотических организмов [9]. Это объясняет широкое применение метода ISSR для картирования геномов, изучения генетического состава популяций, паспортизации растений, а также в филогенетических исследованиях.

Праймеры ISSR состоят из коротких 2–4 тандемных повторов, общей длиной 15–24 нуклеотида и одного селективного нуклеотида на 3'-конце [10], при этом температура отжига, зависящая от GC-состава, как правило, находится в пределах 45–65 °С.

Настоящая статья посвящена влиянию различных параметров полимеразной цепной реакции на специфичность и воспроизводимость амплификации на примере образца вида *Stipa lessingiana* Trin. et Rupr. рода *Stipa L.* (Poaceae).

Материалы и методы

В качестве объекта исследования был взят гербарный материал *Stipa lessingiana* 2014 года. Выделение геномной ДНК производилось согласно протоколу коммерческого набора DiamondDNA Plant Kit D. Выделенная ДНК растворялась в 100 мкл ТЕ-буфера. Концентрацию и качество выделенной ДНК

оценивали, используя спектрофотометрическое отношение поглощения света при длинах волн 230, 260 и 280 нм с помощью спектрофотометра P330 (Implex, Германия).

Для амплификации были использованы три ISSR праймера – M2 ((AC)₈YG), HB14 ((CTC)₃GC) и 17899B ((CA)₆GG). При оптимизации условий были протестированы несколько параметров ПЦР: количество циклов (20, 25, 30, 35, 40), температура отжига праймеров (от 48 до 58 °С, 8 вариаций), а также компоненты реакционной смеси: ДНК (количество от 0,63 до 200 нг на реакцию, 9 вариаций), MgCl₂ (концентрация от 1,5 мМ до 8,5 мМ, 8 вариаций), праймер (0,04 до 5,33 мкМ, 8 вариаций), dNTPs (от 0,025 до 6,4 мМ, 9 вариаций), Taq-полимераза (от 0,31 до 2,5 еа, 4 вариации). Реакция без ДНК была использована как отрицательный контроль. Достоверность ДНК-спектров проверялась трехкратной постановкой ПЦР.

Для полимеразной цепной реакции использовались реактивы фирмы Thermo Scientific, общий объем готовой реакционной смеси составил 15 мкл: ПЦР-буфер – 1,5 мкл (10x с KCl и 15 мМ MgCl₂); dNTPs – 0,12 мкл (25 мМ); MgCl₂ – 0,6 мкл (25 мМ); Taq-полимераза – 0,25 мкл (5 еа/мкл); ISSR праймер – 1 мкл (10 мМ); dH₂O – 9,53 мкл; образец ДНК – 1 мкл (10 нг).

ПЦР проводили в программируемом термоциклере Thermal Cycler S1000 (Bio-Rad, США). Условия амплификации: первичная денатурация ДНК – 3 мин при 95 °С, затем 35 циклов, включающих три этапа: 30 с при 95 °С, 30 с при 50 °С, 1 мин при 72 °С; финальная достройка цепей – 10 мин при 72 °С, затем охлаждение до 4 °С.

Электрофоретическое разделение продуктов ПЦР проводили в течение 3 часов при напряжении 70 В с помощью горизонтальных камер SE-1 и SE-2 фирмы Helicon в 1,5 %-м, 1,9 %-м и 2,25 %-м агарозных гелях с добавлением бромистого этидия. В качестве буферного раствора использовали 1x TAE. Последующая визуализация проходила на системе гель-документирования Universal Hood II (Bio-Rad, США).

Результаты и обсуждение

Были исследованы несколько параметров полимеразной цепной реакции, способные оказать влияние на воспроизводимость и качество профиля ISSR-фрагментов ДНК. Для всех трех праймеров (M2, HB14 и 17899B) установлено, что число и четкость бэндов лучше всего регулируется изменением температуры отжига, а также концентрациями Taq-полимеразы и MgCl₂, в то время как количество исходной ДНК-матрицы наименьшим образом сказывается на спектре ПЦР-продуктов.

При выборе оптимальной температуры отжига следует учитывать, что при низкотемпературном отжиге увеличивается неспецифичная амплификация, приводящая к артефактным полосам при визуализации [11, 12].

Полученные результаты демонстрируют, что воспроизводимые профили ISSR-фрагментов ДНК могут быть получены в широком диапазоне условий эксперимента. При этом лучшие результаты амплификации были получены в присутствии 10 нг геномной ДНК; 0,67 мкМ праймера; 2,5 мМ MgCl₂; 0,2 мМ dNTPs; 1,25 е.а. Taq-полимеразы; 10x ПЦР-буфера, количестве циклов – 30, температуре отжига для всех трех праймеров – 50 °С. Наилучшие результаты визуализации получены при постановке электрофореза в 2,25%-м агарозном геле, при этом диапазон полученных бэндов составил от 200 до 1000 п.н. в зависимости от праймера.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Meyer W., Mitchell T.G., Freedman E.Z., Vilgalys R. Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in the polymerase chain reaction to distinguish strains of *Cryptococcus neoformans* // *J Clin Microbiol.* – 1993. – № 31. – P. 2274–80.
2. Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) – anchored polymerase chain reaction amplification // *Genomics.* – 1994. – № 20. – P. 176–183.
3. Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers // *Nucleic Acids Res.* – 1990. – № 18. – P. 6531–6535.
4. Tautz D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers // *Nucleic Acid. Res.* – 1989. – № 17. – P. 6463–6471.
5. Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting // *Nucleic Acid. Res.* – 1995. – № 11. – P. 4407–4414.
6. Galvan M.Z., Bornet B., Balatti P.A. and Branchard M. Inter simple sequence repeat (ISSR) markers as a tool for the assessment of both genetic diversity and gene pool origin in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) // *Euphytica.* – 2003. – № 132. – P. 297–301.
7. Korbin M., Kuras A. and Urawicz E. Fruit plant germplasm characterisation using molecular markers generated in RAPD and ISSR PCR // *Cell Mol. Biol. Lett.* – 2002. – № 7(2B). – P. 785–794.
8. Yang W.P., Oliveira A.C., Godwin I., Schertz K. and Bennetzen J.L. Comparison of DNA marker technologies in characterizing plant genome diversity: variability in Chinese sorghums // *Crop Sci.* – 1996. – № 36. – P. 1669–1676.
9. Metzgar D., Bytof J., Wills C. Selection against frameshift mutations limits microsatellite expansion in coding DNA // *Genome Research.* – 2000. – № 10. – P. 72–80.
10. Kalendar R., Grob T., Regina M., Suoniemi A., Schulman A. IRAP and REMAP: Two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques // *Theor Appl Genet.* – 1999. – № 98. – P. 704–711.
11. Hyndman D.L. and Mitsuhashi M. PCR primer design // *Methods Mol. Biol.* – 2003. – № 226. – P. 81–88.
12. Roux K.H. Optimization and troubleshooting in PCR // *PCR Methods Appl.* – 1995. – № 4. – P. 185–194.