



УДК 633.853.52:575

DOI 10.25230/conf12-2023-242-246

## ДЕТЕКЦИЯ ФРАГМЕНТОВ ДНК ПРИ ПРОВЕДЕНИИ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ПАСПОРТИЗАЦИИ СОРТОВ СОИ

Савиченко В.Г., Рамазанова С.А.

ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК

psld.leta@mail.ru

ДНК-маркеры эффективны при определении оригинальности и однородности сортов сельскохозяйственных культур. При этом точность анализа зависит не только от надежности маркерной системы, но и от метода детекции ПЦР-продуктов. Целью исследования являлось определение наиболее эффективного метода детекции фрагментов ДНК при создании молекулярно-генетических паспортов сортов сои. ПЦР продукты пяти микросателлитных маркеров разделяли методом электрофореза в агарозном геле, в нативном ПААГ, в ПААГ в денатурирующих условиях и с помощью фрагментного анализа методом капиллярного электрофореза. Наиболее предпочтительным для молекулярно-генетической паспортизации сортов сои оказался метод детекции фрагментов ДНК с помощью фрагментного анализа.

Ключевые слова: соя, ПЦР, SSR, капиллярный электрофорез, фрагментный анализ, паспортизация, идентификация сортов.

**Введение.** На сегодняшний день генетическая паспортизация является эффективным инструментом для определения оригинальности и однородности сортов сои и других сельскохозяйственных культур. В ее основе лежит анализ полиморфизма ДНК растений с использованием молекулярно-генетических маркеров. Наиболее адаптированы для этого высокополиморфные и кодоминантные микросателлитные (SSR) маркеры, применение которых позволяет выявлять большое аллельное разнообразие среди исследуемых образцов и устанавливать различия между ними.

Точность анализа ДНК зависит от многих факторов – качества выделенной ДНК, условий проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР), а также метода детекции фрагментов ДНК, полученных в результате амплификации. При благоприятном сочетании первых двух факторов выбор метода детекции ПЦР-продуктов может являться решающим в идентификации сортов.

В большинстве случаев детекцию результатов амплификации проводят методом гелевого электрофореза с последующим окрашиванием специальными красителями (бромистый этидий, SYBR Green I, нитрат серебра). В геле отрицательно заряженные молекулы ДНК движутся от отрицательного электрода к положительному. Отличающиеся по длине фрагменты ДНК движутся с разной скоростью – короткие фрагменты мигрируют быстрее длинных [1, 2]. Их размер определяют относительно стандарта молекулярного веса.

На электрофоретическое разделение ПЦР-продуктов также влияет тип и концентрация геля, электрофорезного буфера, напряжение электрического поля, сила тока и другие факторы. Так, агарозный гель имеет меньшую разрешающую способность по сравнению с полиакриламидным (ПААГ). Гели имеют свойство молекулярного сита и, изменяя их концентрацию, можно задать определенный размер пор. Кроме того, в ПААГ можно проводить как нативный электрофорез (для не подвергнутых денатурации фрагментов), так и электрофорез в денатурирующих условиях (за счет наличия хаотропных агентов, обычно мочевины). Разделение ПЦР-продуктов методом нативного электрофореза зависит не только от длины фрагмента, но и от пространственной структуры нуклеиновой кислоты. Электрофорез в



денатурирующих условиях разделяет ДНК только по молекулярной массе, поскольку в денатурированном состоянии молекула ДНК имеет одноцепочечную структуру [1].

Одноцепочечные фрагменты ДНК также разделяют методом капиллярного электрофореза с помощью современных генетических анализаторов (Нанофор 05, ABI Prism® 3500xl). Электрофорез проходит в капиллярах, заполненных полимером, где движутся меченные флуоресцентным красителем фрагменты ДНК и детектируются сигналом флуоресценции. Определение размеров фрагментов ДНК исследуемых образцов происходит посредством сравнения их с размерным стандартом. При этом размерный стандарт вносят в каждый исследуемый образец, поэтому ошибки, связанные с изменениями подвижности фрагментов из-за разности условий проведения эксперимента, исключаются [3].

Перечисленные методы детекции используют в равной мере в зависимости от целей исследования и технической оснащённости лабораторий. И поскольку на сегодняшний день не существует общепринятой технологии генотипирования сельскохозяйственных растений, целью данного исследования стало определение наиболее эффективного метода детекции фрагментов ДНК при создании молекулярно-генетических паспортов сортов сои.

Материалы и методы. Исследование проводили в лаборатории молекулярно-генетических исследований ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК. Материалом были выбраны 10 сортов сои разного происхождения: Вильямс 82, Пума, Зара, Триада, Саяна, Самер 2, Лидия, Витязь 50, Венера и Уника. Экстракцию ДНК из зародышей сухих семян осуществляли с помощью набора для выделения DiamondDNA Plant (ООО АВТ, РФ) согласно прилагаемой инструкции.

ПЦР проводили с использованием 5 SSR-маркеров (Satt532, Soypr1, Satt681, Satt149, Soyhsp176) по ранее установленным протоколам [4, 5] в амплификаторе MiniAmp Plus (Thermo Fisher, США). Прямые праймеры были модифицированы флуоресцентной меткой (FAM, R6G, TAMRA или ROX).

Разделение полученных в результате ПЦР фрагментов ДНК производили следующими методами. Электрофорез в 2 % агарозном геле проводили в камере горизонтального электрофореза SE-2 (Хеликон, РФ) при силе тока 90 mA и напряжении 180 V в течение 30-45 мин. Электрофорез в 8 % ПААГ в нативном состоянии проводили в камере для вертикального электрофореза VE-20 (Хеликон, РФ) при силе тока 45 mA и напряжении 230 V в течение 2 ч 30 мин. Гели окрашивали бромистым этидием. Документирование результатов электрофореза обеспечивалось при помощи системы цифровой документации видеоизображения BIO-PRINT (Vilber Lourmat, Франция).

Электрофорез в 8 % ПААГ в денатурирующих условиях также проводили в камере для вертикального электрофореза VE-20, предварительно денатурируя пробы. Параметры силы тока и напряжения – 200 mA, 800 V. Гель окрашивали нитратом серебра и фотографировали на экране белого света. Выявленные аллели каждого локуса обозначали цифрами от 1 до 5, где 1 – фрагмент ДНК с максимальным значением молекулярного веса, 5 – с минимальным.

Разделение продуктов амплификации методом капиллярного электрофореза в денатурирующих условиях осуществляли на генетическом анализаторе Нанофор 05 (ИАП РАН, РФ), используя полимер ПДМА 6 (ООО «Синтол», РФ). Предварительная подготовка проб включала смешивание ПЦР-продуктов с 0,5 µL размерного стандарта СД-600 и 8,5 µL деионизированного формамида (ООО «Синтол», РФ), затем проводили нагрев проб при 95 °C в течение 5 мин и охлаждение при 4 °C в течение 5 мин. Размер фрагментов ДНК определяли относительно размерного стандарта СД-600 с помощью GeneMarker software version 3.0.1 (SoftGenetics, State College, США).

Результаты и обсуждение. Микросателлитные маркеры, обладающие высоким уровнем полиморфизма, позволяют надежно различать генотипы сои. Однако идентификация образцов, отличающихся на 1–3 микросателлитных повтора, на этапе детектирования фрагментов ДНК может быть затруднена.



Детекцию результатов амплификации осуществляли следующим образом: по каждому маркеру продукты одной реакции разделяли методом электрофореза в агарозном геле, ПААГ в нативном состоянии, ПААГ в денатурирующих условиях, а также методом капиллярного электрофореза в полимере ПДМА 6. На рисунке представлены электрофореграммы разделения фрагментов ДНК сортов Уника, Пума, Вильямс 82 и Самер 2 (для наглядности электрофореграммы *а, б, в* перевернуты в вертикальное положение).

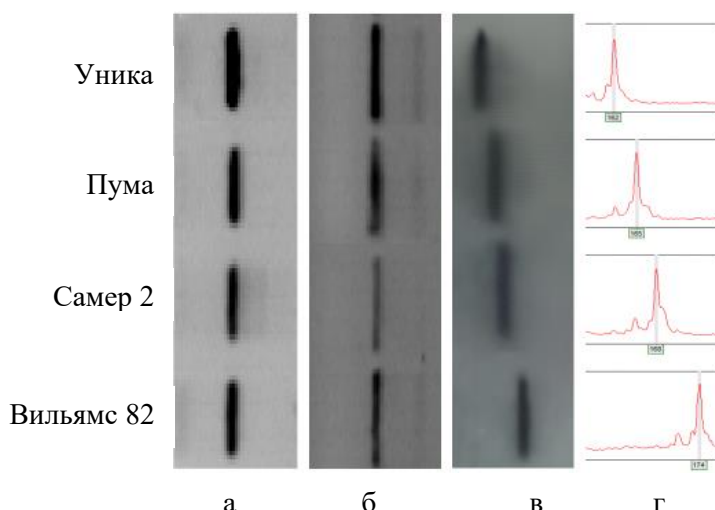


Рисунок – Результаты разделения ПЦР-продуктов маркера Satt532 после электрофореза: а – в агарозном геле; б – в нативном ПААГ; в – ПААГ в денатурирующих условиях; г – электрофореграмма капиллярного электрофореза (ориг.)

По результатам электрофореза в агарозном геле (а) различий между образцами по локусу Satt532 не наблюдается. В ПААГ (б) в нативном состоянии выявлено два аллельных варианта, соответствующих фрагментам ДНК изучаемых образцов: 1 у сортов Вильямс 82 и Самер 2, 2 – Уника и Пума. Однако при разделении ПЦР-продуктов методом электрофореза в ПААГ в денатурирующих условиях четко видна дифференциация всех образцов, что также подтверждает фрагментный анализ, проведенный методом капиллярного электрофореза. Таким образом, всего в локусе Satt532 было выявлены четыре аллельных варианта с размерами фрагментов ДНК 162, 165, 168 и 174 п.н.

Сравнение результатов разделения ПЦР-продуктов пяти микросателлитных маркеров в зависимости от метода детекции представлено в таблице 1.

Таблица 1. Результаты разделения ПЦР-продуктов в зависимости от метода детекции

№	Локус	Количество выявленных аллелей			Размер аллелей, выявленных методом капиллярного электрофореза, п.н.
		в агарозном геле	в нативном ПААГ	в денатурирующем ПААГ	
1	Satt532	1	2	4	162, 165, 168, 174
2	Soypr1	2	2	3	154, 181, 184
3	Satt681	3	3	5	234, 237, 240, 243, 246
4	Satt149	3	3	4	253, 262, 277, 280
5	Soyhsp176	2	2	2	101, 103, 113

Из таблицы видно, что по всем локусам, кроме Satt532, количество выявленных аллелей в результате электрофореза в агарозном и нативном полиакриламидном гелях не отличалось. При этом, при разделении ДНК-фрагментов методом электрофореза в ПААГ в денатурирующих условиях по всем маркерам (кроме Soyhsp176) было обнаружено большее



количество аллелей. Это говорит о высокой разрешающей способности данного метода. Методом капиллярного электрофореза по локусу *Soyhsp176* был обнаружен еще один аллель, а также определены точные размеры всех выявленных фрагментов.

Низкая разрешающая способность агарозного геля и неденатурирующего ПААГ не позволила дифференцировать 10 изучаемых сортов сои. Образцы, отличающиеся на 2–12 п.н., в данных видах гелей были неразличимы. Поэтому использовать эти методы детекции при молекулярно-генетической паспортизации сортов нецелесообразно. Метод электрофореза в ПААГ в денатурирующих условиях оказался более эффективным для разделения ПЦР-продуктов. Однако данный метод является очень трудоемким на всех этапах процесса от пробоподготовки до анализа результатов детекции. Определение размера фрагментов ДНК зависит от наличия и размерности стандарта с известными длинами фрагментов (в диапазоне возможных длин фрагментов исследуемых образцов). Из-за особенностей проведения электрофореза электрофоретический фронт часто подвержен искривлению, что также влияет на точность определения длины фрагментов ДНК. Количество исследуемых образцов на один гель ограничивается не только размерами камеры для электрофореза, но и необходимостью большого количества контрольных образцов.

Капиллярный электрофорез характеризуется высокой производительностью. Возможность загрузки 96 образцов, автоматизация ввода пробы и точное определение размера фрагментов ДНК исключает ошибки, возникающие при детектировании другими методами. Полученные данные о размерах фрагментов ДНК исследуемых образцов в результате фрагментного анализа представлены в таблице 2.

Таблица 2. Фрагментный анализ ДНК сортов сои

Локус	Вильямс 82	Пума	Зара	Триада	Саяна	Самер 2	Лидия	Витязь 50	Венера	Уника
	Размер фрагментов ДНК, п.н.									
Satt532	168	165	165	168	165	174	165	165	165	162
Soypr1	181	184	181	154	154	181	181	181	181	154
Satt681	243	240	240	240	240	240	234	237	246	240
Satt149	277	253	253	253	262	253	280	253	277	262
Soyhsp176	101	101	101	101	101	113	101	113	101	103

С помощью фрагментного анализа 10 сортов сои были дифференцированы по пяти микросателлитным маркерам. Получены уникальные наборы аллелей для каждого сорта. Только с помощью данного метода по локусу *Soyhsp176* был обнаружен фрагмент ДНК с размером 103 п.н. (сорт Уника), отличающийся от других фрагментов всего на 2 п.н. Таким образом данный метод является наиболее предпочтительным при проведении молекулярно-генетической паспортизации сортов сои.

**Заключение.** Сравнение электрофореграмм разделения ПЦР-продуктов в различных видах гелей показало, что наиболее эффективным методом детекции фрагментов ДНК при создании молекулярно-генетических паспортов сои является фрагментный анализ, выполненный с помощью капиллярного электрофореза. Данный метод имеет самую высокую разрешающую способность среди изученных методов и позволяет определить точный размер фрагментов ДНК, что является важным параметром при экспертизе сортов.



## Литература

1. Кутлунина Н.А., Ермошин А.А. Молекулярно-генетические методы в исследовании растений: учеб.-метод. пособие. М-во образования и науки Рос. Федерации, Урал. федер. ун-т. Екатеринбург: Изд-во Урал. ун-та, 2017. 142 с.
2. Полиданов М.А., Блохин И.С., Скороход А.А., Алиева С.Г., Тупикин Д.В., Щербакова И.В. Методика электрофореза в агарозном геле // *Modern Science*. 2020. № 3–2. С. 69–72.
3. Заруцкий И.В., Манойлов В.В., Самсонова Н.С., Петров А.И., Курочкин В.Е., Леонтьев И.А., Алексеев Я.И. Метод поиска пиков размерного стандарта при фрагментном анализе ДНК // *Журнал технической физики*. 2018. Т. 88. Вып. 9. С. 1407–1412.
4. Рамазанова С.А., Савиченко В.Г., Устарханова Э.Г., Логинова Е.Д., Рамазанов Р.Н., Гучетль А.Х. Поиск новых SSR-локусов ДНК для создания эффективной технологии генотипирования сои // *Масличные культуры*. 2021. № 4 (188). С. 18–24.
5. Ramazanova S.A., Savichenko V.G., Guchetl S.Z. Genetic analysis of the homogeneity of soybean varieties by microsatellite loci // *IOP conference series: earth and environmental science. International conference on production and processing of agricultural raw materials*. 2021. С. 012007.

### **DNA FRAGMENT DETECTION IN MOLECULAR GENETIC CERTIFICATION OF SOYBEAN VARIETIES**

**Savichenko V.G., Ramazanova S.A.**

V.S. Pustovoit All-Russian Research Institute of Oil Crops

DNA markers are effective in determining the originality and homogeneity of crop varieties. The accuracy of analysis depends not only on the reliability of the marker system, but also on the method of detection of PCR products. The purpose of the study was to determine the most effective method of DNA fragment detection when developing molecular genetic passports for soybean varieties. PCR products of five microsatellite markers were separated by electrophoresis in agarose gel, in native polyacrylamide gel, in polyacrylamide gel under denaturing conditions and by fragment analysis by capillary electrophoresis. The method of DNA fragment detection by fragment analysis proved to be the most preferable for molecular genetic certification of soybean varieties.

Key words: soybean, PCR, SSR, capillary electrophoresis, fragment analysis, certification, variety identification