

С. К. НҰРАЛИЕВ, Б. О. БЕКМАНОВ, Е. А. ДОСАЛИЕВА, Е. А. ШАДЕНОВА, Е. Ж.
ЖҰМАБЕКОВ

(ҚР БҒМ ҒК «Жалпы генетика және цитология институты» РМҚ, Алматы қ.)

ҚАЗАҚСТАНДА КЕЗДЕСЕТІН ҚАЙЫҢ АҒАШТАРЫН КЕЗДЕЙСОҚ ПРАЙМЕРЛЕР АРҚЫЛЫ МОЛЕКУЛАЛЫҚ ТҮРҒЫДАН СИПАТТАУ

Аннотация

Бұл жұмыста Қазақстан аумағында кездесетін қайың ағаштарына зертханалық жағдайда кездейсоқ праймерлер арқылы молекулалық-генетикалық талдаулар жүргізілді. Нәтижесінде зерттеуге алынған қайың формаларында бір-бірінен айтарлықтай айырмашылықтар болатыны анықталды.

Кілт сөздер: қайың, ген, жартылай кездейсоқ праймерлер, молекулалық маркерлер, микроклондау.

Ключевые слова: березы, гены, полуслучайные праймеры, молекулярные маркеры, микроклонирование.

Key words: birch, genes, semi specific primers, molecular markers, microcloning.

Қайың (*Betula L.*) туысы жылу энергетикасы саласында шикізат есебінде қолданылатын практикалық маңызы зор, сонымен қатар орман шаруашылығында сәндік ағаштар ретінде де селекциялық-генетикалық тұрғыдан өте құнды нысандардың біріне жатады. Қайың ағашы Қазақстан аумағында көбінесе Тобыл, Есіл, Ертіс бойында, Ақмола, Ақтөбе облыстарында, Жем, Зайсан алқабында, Жетісу (Жоңғар), Іле Алатауларында кеңінен таралған және негізінен бұл аймақтарда қайыңның 15 түрі өседі [1]. Қазақстанда ең көп тараған түрі – сүйелді қайың (*B. pendula*). Қолайлы жағдайларда қайың ағашының биіктігі 25–30 метрге, ал диаметрі 80 см дейін жетеді және қабығы ақ түсті болады [1]. Қайың ағашын зертханалық жағдайда микроклондау арқылы өсіру, көбейту және молекулалық-генетикалық жағынан сипаттау қазіргі кездегі жаппай көгалдандыру бағытының өзекті мәселелерінің біріне жатады.

Молекулалық маркерлеу биология ғылымының іргелі және қолданбалы салаларында кеңінен қолданылады. Полимеразды тізбекті реакция негізінде қолданылатын молекулалық маркерлер өздерінің қарапайым болуымен және әдістерінің оңай болуына

байланысты организмдерді моле-кулалық-генетикалық тұрғыдан сипаттауда қолданылады [2, 3]. Олардың арасындағы ең көп таралғаны RAPD-маркерлер деп аталады (Random Amplified Polymorphic DNA). Бұл топтағы маркерлер ПТР әдісінің негізінде кездейсоқ праймерлер арқылы сипатталады. Мұндай праймерлерді синтездеуде зерттелетін организмнің толық геномын білу шарт емес. Синтезделетін праймерлер тек кейбір талаптарға сай болса болғаны, мысалы, гуанин/цитозин жұптарының (GC, шамамен 60%) шамасы және праймердің ұзындығы. Бұл әдіс бір-біріне тәуелсіз екі зерттеушілер арқылы ұсынылған және *RAPD* деп аталды [4, 5]. Бұл әдістің негізі бірізді праймер арқылы тізбекке жабысу (отжиг) температурасы төмен жағдайда ДНҚ молекуласының фрагменттерін көбейтуге (амплификациялауға) арналған. Праймер геномдық ДНҚ молекуласының екі қарама-қарсы бөліктерімен байланысады да, ары қарай синтезделеді. Амплификацияланған бөліктерді электрофорез арқылы ажыратқанда көлемі шамамен 100–5000 нуклеотид жұп аралығында болатын өнімдер пайда болады. Оларды *ДНҚ петтерндер* деп атайды. Осы өнімдерді талдай отырып зерттеуге алынған организмді молекулалы-генетикалық тұрғыдан сипаттайды [5].

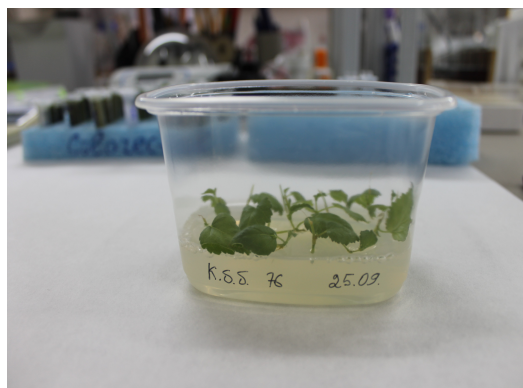
Зерттеу материалдары мен әдістері. Бұл жұмыста Алматы обылысы Есік ауылы орман өсім-діктері дендрари паркінде өсетін Даур және Беларусия Ғылым академиясы Орман биологиясы институтынан алынған Карель қайың ағаштары қолданылды. Олар зертханалық жағдайда микро-клондау әдісімен өсірілді. Ары қарай ДНҚ молекуласын бөліп алуға осы клондалған өсімдіктердің жапырақтары алынды.

ДНҚ молекуласын бөлу. Лизисті буфер алдын ала 30 минутқа 60°C температурада термостатқа қойылды. Ары қарай өсімдік жапырағын сұйық азотта ұнтақ күйге келгенше езілді және оған 400 мкл көлемде лизис буфері құйылды. Алынған сұйықтық эппендорф пробиркаларына көшірілді де, шамамен 30 минут 60°C температурада термостатта ұсталды. Ары қарай осы пробиркаларға әрқайсысы 100 мкл көлемде хлороформ және изоамил спирті құйылып, ұқыпты араластырылды және бөлме температурасында шамамен 20 минут ұсталды. Келесі ретте минутына 6000 айналым жасайтын центрифугада 10 минут айналдырылды. Сонан соң 10 мкл 0,5M NaCl және екі көлемде 96% спирт құйылды да, ары қарай шамамен 20 минут +4°C температурада ұсталды. Сонан соң 3 минут 3000 айналым жасайтын центрифугада айналдырылып, түзілген тұнба ауада кептірілді. Кепкен тұнбаға шамамен 50 мкл dH₂O құйылды. Егер де бөлінген ДНҚ молекуласын ұзақ уақыт сақтау керек болса, онда оны –20°C температурада сақтаған жөн.

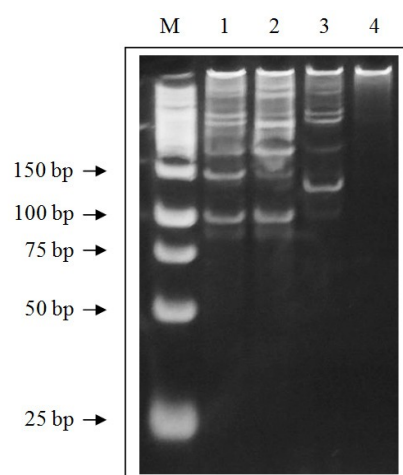
Полимеразды тізбекті реакция. Полимеразды тізбекті реакция (ПТР) стандартты әдіспен жүзе-ге асырылды. 20 мкл реакциялық қоспада шамамен 50–100 нг бөлініп алынған ДНҚ молекуласы, 0.1 пмоль концентрациясында 12 тізбекті праймер: SR1 5'-AGC AGG TCA GGC-3' және 5'- AGC AGG TTG CCG-3', 1x ПТР буфері (150 mM Tris-HCl, pH 0,8, 500 mM KCl), 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM дезоксинуклеотидүшфосфат (dNTP), 1U *Taq* полимераза ферменті болды. *ПТР шарты.* Қолданылған 12 тізбекті праймер үшін: 5 мин 93°C, 33 цикл (17 сек 93°C, 40 сек 37°C, 40 сек 72°C), ары қарай 5 мин 72°C. Зерттеу нәтижесінде пайда болған ДНҚ молекуласының бөліктері 1%-дық агароздық геледе УК-сәулесінде трансиллюминатор көмегімен талданды. Молекулалық салмағын анықтауда коммерциялық маркер 100 bp DNA Ladder, GeneRuller (Ферментас, Литва) қолданылды.

Зерттеу нәтижелері және оларды талқылау

Қайың ағаштарына молекулалық-генетикалық зерттеулер жүргізбестен бұрын алдымен олар зертханалық жағдайда микроклональды жолмен көбейтіліп алынды. Өсімдіктерді мироклональды жолмен көбейту арқасында өте аз уақыттың ішінде селекциялық тұрғыдан құнды материалдар алуға болады. Сонымен қатар *in vitro* жағдайында микроклональды көбейтуде егілетін материал-дың патогенді микроорганизмдерден және вирустардан тазалануы жүреді. Төмендегі 1-ші суретте зертханалық жағдайда қоректік ортада микроклональды жолмен өсірілген қайың ағаштарының клондары көрсетілген (1-сурет).



1-сурет – Қайыңдарды *in vitro* жағдайда микроклондау әдісімен өсіру



М – молекулалық маркер (100 bp DNA Ladder, GeneRuller);

1–2 – Даур қайыңы; 3 – Карель қайыңы; 4 – ішкі бақылау.

2 сурет – Қайың ағаштары ДНҚ молекуласының

амплификацияланған аймақтарының спектрі

Ары қарай осындай жолмен өсірілген қайың ағаштарынан ДНҚ молекуласы бөлініп алынды. Бөлініп алынған ДНҚ молекулаларының агарозды электрофорезде сапасы және спектрофотометрде концентрациясы анықталды. Келесі ретте осы ДНҚ молекулаларына кездейсоқ праймерлер көмегімен полимеразды тізбекті реакциялар қойылды.

12-мүшелік жартылай кездейсоқ праймерлерді қолдану арқылы жүргізілген полимеразды тізбекті реакция нәтижелері төмендегі 2-суретте көрсетілген.

Даур және Карель қайыңдарының электрофорездік спектрінде айтарлықтай айырмашылықтар болатыны байқалды, яғни қайыңның әр түрі өзіне ғана тән молекулалық спектр көрсетеді. Қолда-нылған 12-мүшелік праймерді келесі ретте Даур, Карель және басқа да қайыңдарды генетикалық жағынан сипаттауға қолдануға болады. Көптеген әдебиет беттеріндегі зерттеулерден RAPD-прай-мерлер арқылы зерттеліп жатқан нысанды молекулалық-генетикалық тұрғыдан сипаттауға бола-тындығы айтылған [6-8]. Біздің зерттеулерімізден алынған нәтижелерге қарап 12-мүшелік прай-мерлер арқылы қайың ағаштарының зертханалық жағдайда өсірілетін клондарын молекулалық паспорттауға болатындығын көруге болады. Сонымен қатар осы алынған нәтижелер көмегімен қайың ағаштарының шығу тегіне де талдаулар жүргізуге болады. Алынған нәтижелер дәйекті болу үшін келесі ретте басқа да 12-мүшелік және 15-мүшелік жартылай кездейсоқ праймерлер арқылы және де екі праймерлік комбинациялар арқылы да нәтижелер алып талдау керек.

Аталған жұмыс Қазақстан Республикасы Білім және ғылым министрлігі Ғылым комитетінің қаржы-ландыруымен жүзеге асырылды (грант №164/ГФ2).

ӘДЕБИЕТ

1 Иващенко А.А. Растительный мир Казахстана. – Алматы: Алматы кітап баспасы, 2004. – 240 с.

2 Гостимский С. А., Кокаева З. Г., Коновалов Ф. А. Изучение организации и изменчивости генома растений с по-мощью молекулярных маркеров // Генетика. – 2005. – Т. 41. – С. 480-492.

3 Хлесткина Е. К., Салина Е. А. SNP-маркеры: методы анализа, способы разработки и сравнительная характеристика на примере мягкой пшеницы // Генетика. – 2006. – Т. 42. – № 6. – С. 725-736.

4 Hu J., van Eysden J., Quiros C. F. Generation of DNA-based markers in specific genome regions by twoprimer RAPD reactions // PCR Methods Appl. – 1995. – Vol. 4. – P. 346-351.

5 Przetakewicz J., Nadolska-Orczyk A., Orczyk W. The use of RAPD and semi-random markers to verify somatic hybrids between diploid lines of *Solanum tuberosum* L. // Cellular and Molecular Biology Letters. – 2002. – Vol. 7. – P. 671-676.

6 Sant'Anna J.R., Miyamoto C.T., Rosada L.J. et al. Genetic relatedness of Brazilian *Colletotrichum truncatum* isolates assessed by vegetative compatibility groups and RAPD analysis // Biol. Res. – 2010. – Vol. 43. – P. 51-62.

7 Saini A., Dua A., Mohindra V., Lakra W.S. Molecular discrimination of six species of *Bagrid catfishes* from Indus river system using randomly amplified polymorphic DNA markers // Mol. Biol. Rep. – 2011. – Vol. 38(5). – P. 2961-2965.

8 Wolf H.T., Zündorf I., Winckler T. et al. Characterization of *Echinacea species* and detection of possible adulterations by RAPD analysis // Planta Med. – 1999. – Vol. 65(8). – P. 773-774.

REFERENCES

1 Ivaschenko A.A., Rastitel'nyj mir Kazahstana. – Almaty: Almatykitap baspasy, 2004. – 240 c. (in Russ).

2 Gostimskij S. A., Kokaeva Z. G., Konovalov F. A. Izuchenie organizacii i izmenchivosti genoma rastenij s pomoshh'ju molekuljarnyh markerov // Genetika. – 2005. – Vol. 41. – S. 480-492. (in Russ).

3 Hljostkina E. K., Salina E. A. SNP-markery: metody analiza, sposoby razrabotki i sravnitel'naja harakteristika na primere mjadkoj pshenicy // Genetika. – 2006. – Vol. 42, N 6. – S. 725-736. (in Russ).

4 Hu J., van Eysden J., Quiros C. F. Generation of DNA-based markers in specific genome regions by twoprimer RAPD reactions // PCR Methods Appl. – 1995. – Vol. 4. – P. 346-351.

5 Przetakewicz J., Nadolska-Orczyk A., Orczyk W. The use of RAPD and semi-random markers to verify somatic hybrids between diploid lines of *Solanum tuberosum* L. // Cellular and Molecular Biology Letters. – 2002. – Vol. 7. – P. 671-676.

6 Sant'Anna J.R., Miyamoto C.T., Rosada L.J. et al. Genetic relatedness of Brazilian *Colletotrichum truncatum* isolates assessed by vegetative compatibility groups and RAPD analysis // Biol. Res. – 2010. – Vol. 43. – P. 51-62.

7 Saini A., Dua A., Mohindra V., Lakra W.S. Molecular discrimination of six species of *Bagrid catfishes* from Indus river system using randomly amplified polymorphic DNA markers // Mol. Biol. Rep. – 2011. – Vol. 38(5). – P. 2961-2965.

8 Wolf H.T., Zündorf I., Winckler T. et al. Characterization of *Echinacea species* and detection of possible adulterations by RAPD analysis // Planta. Med. – 1999. – Vol. 65(8). – P. 773-774.

Резюме

С. К. Нуралиев, Б. О. Бекманов, Е. А. Досалиева, Е. А. Шаденова, Е. Ж. Жумабеков

(РГП «Институт общей генетики и цитологии» КН МОН РК, г. Алматы)

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БЕРЕЗ, ПРОИЗРАСТАЮЩИХ В
КАЗАХСТАНЕ,
ПРИ ПОМОЩИ ПЦР С ПОЛУСЛУЧАЙНЫМИ ПРАЙМЕРАМИ

В этой работе приведены результаты экспериментальных исследований по молекулярно-генетической характеристике берез, произрастающих в Казахстане с помощью полуслучайных праймеров. Показано, что у исследуемых берез наблюдаются отличия по молекулярно-генетическим параметрам.

Ключевые слова: березы, гены, полуслучайные праймеры, молекулярные маркеры, микроклонирование.

Summary

S. K. Nuralyev, B. O. Bekmanov, E. A. Dosalyeva, E. A. Shadenova, E. Zh. Zhumabekov

(«Institute of General Genetics and Cytology» CS MES RK, Almaty)

MOLECULAR CHARACTERIZATION BIRCH GROWING
IN KAZAKHSTAN USING PCR WITH SEMI-SPECIFIC PRIMERS

This work presents the results of experimental studies on the molecular-genetic characteristics with semi-specific primers of birches growing in Kazakhstan. It is shown that the investigated birch observed differences in molecular genetic parameters.

Key words: birch, genes, semi-specific primers, molecular markers, microcloning.

Поступила 27.03.2013 г.