

УДК 58.006:577.23

## **ПРИМЕНЕНИЕ БИОАНАЛИЗАТОРА AGILENT 2100 В РАБОТАХ ПО МОЛЕКУЛЯРНО–ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ПАСПОРТИЗАЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ**

В.С. ПАНКРАТОВ, А.Н. ЮХИМУК, В.Л. ФИЛИПЕНЯ, Е.В. СПИРИДОВИЧ  
ГНУ “Центральный ботанический сад НАН Беларуси”  
Беларусь, 220012, г. Минск, ул. Сурганова, 2В  
e-mail: spiridovich@cbg.basnet.by

*В статье дана характеристика прибора биоанализатор Agilent 2100, описан его принцип работы и указаны его преимущества по сравнению с электрофоретическим разделением фрагментов ДНК в агарозном геле. Обсуждаются возможности применения биоанализатора в работах по молекулярно-генетическому маркированию биологических (в частности ботанических) объектов.*

*Ключевые слова: биоанализатор, молекулярно-генетическое маркирование, RAPD и ISSR маркеры.*

**В**ведение. В настоящее время молекулярно–генетические маркеры широко применяются в филогенетических, популяционно-генетических исследованиях, для изучения и сохранения биологических (в том числе ботанических) коллекций, подтверждения генетической уникальности новых сортов, защиты авторских прав селекционеров и решения многих других задач [1]. Большая часть разработанных на данный момент типов молекулярно–генетических маркеров (например RAPD, ISSR, SSR, AFLP и многие другие) основана на использовании ПЦР, иногда в совокупности с рестрикцией. При проведении молекулярно–генетического маркирования требуется разделение нескольких (а иногда и многих) фрагментов ДНК с высоким разрешением и высокой точностью определения размера фрагмента. Однако классические методы электрофоретического разделения ДНК (в агарозном или полиакриламидном гелях) не всегда отвечают этим требованиям. Кроме того, они требуют больших временных и трудовых затрат, а также использования фотодокументирующих систем с последующей обработкой изображения с помощью специального программного обеспечения. Использование биоанализатора Agilent 2100 для разделения ПЦР-ампликонов позволяет в значительной мере упростить и ускорить данную процедуру, а также повысить точность и надежность получаемых данных.

## Материалы и методы

Выделение ДНК из листьев клюквы крупноплодной (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) сортов Stevens (1), McFarlin (2) и Pilgrim (3) проводилось СТАВ методом, ПЦР ставилась на приборе MasterCycler personal фирмы Eppendorf с праймерами OPA-04 (RAPD) и UBC-808 (ISSR). За основу были взяты параметры и состав ПЦР смеси из Debnath, 2007 [2]. RAPD-ампликоны подвергались разделению путем электрофореза в 2% агарозном геле и на биоанализаторе Agilent 2100 с использованием набора реактивов DNA 7500, ISSR-ампликоны – только на биоанализаторе.

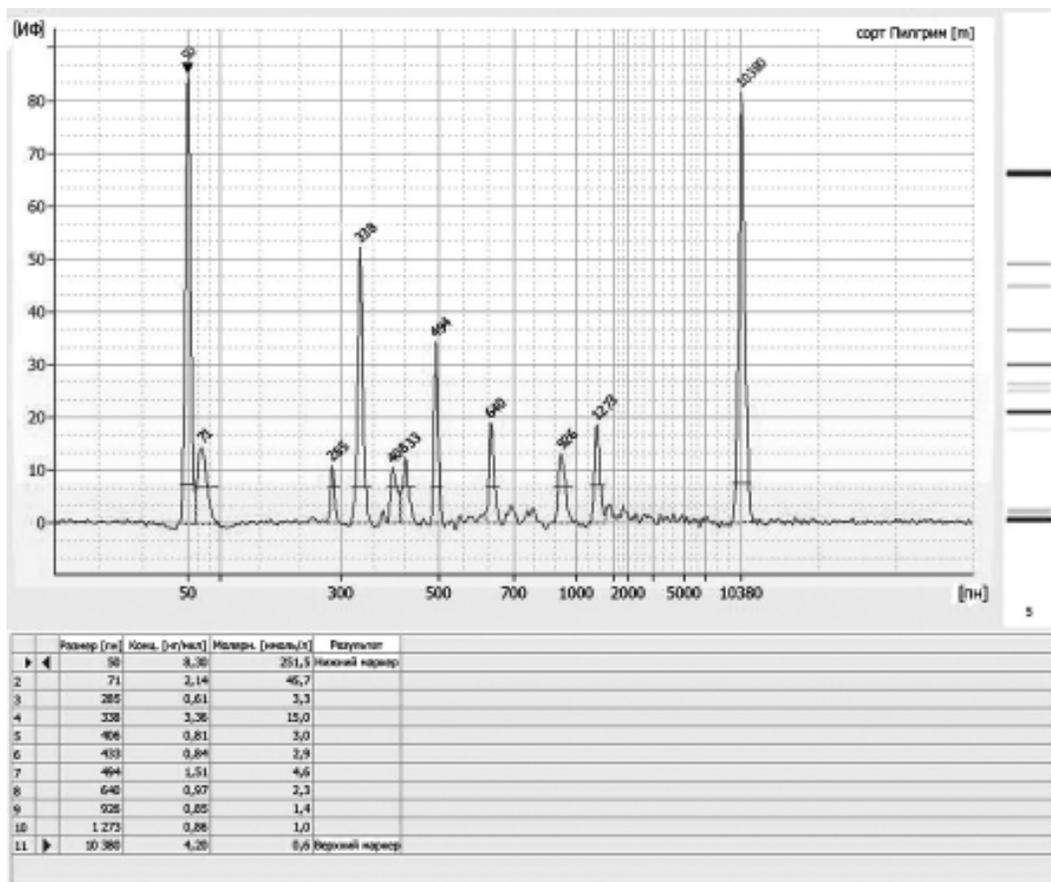
Электрофоретическое разделение ДНК с помощью биоанализатора происходит в специальных пластиковых чипах в системе капилляров, которые при подготовке чипа заполняются гелеобразующим раствором через соответствующие ячейки. Данный раствор содержит флуоресцентный краситель, который связывается с ДНК до застывания геля, что необходимо для последующей детекции. В каждую из двенадцати рабочих ячеек, кроме пробы, добавляется внутренний маркер – фрагменты ДНК минимального и максимального размера (в случае использованного нами набора реактивов DNA 7500 это фрагменты длиной 50 и 10380 п.о.). Это позволяет сравнивать результаты разделения в разных капиллярах. В отдельную ячейку добавляется внешний маркер – смесь фрагментов ДНК известной длины, позволяющий определять размеры фрагментов ДНК в пробах. При работе прибора поочередно происходит электрофоретическое разделение фрагментов в каждом капилляре, начиная с внешнего маркера. Легкие фрагменты ДНК быстрее проходят через капилляр и,

соответственно, первыми проходят мимо детектора. При этом детектор фиксирует повышение уровня флуоресценции, что отображается в виде пика на электрофореграмме (рис. 1). Время появления пика определяется размером фрагмента, а высота пика зависит от концентрации данного фрагмента ДНК в пробе.

Одновременно на основе полученных электрофореграмм создается изображение, имитирующее электрофорез ДНК в агарозном или полиакриламидном геле. Таким образом, прибор позволяет получить электрофореграммы для каждого образца; изображение, имитирующее разделение в геле; а также таблицу, в которой приведены размер, массовая и молярная концентрации для каждого из фиксируемых фрагментов.

## Результаты и обсуждение

Нами было проведено разделение RAPD и ISSR ампликонов, полученных для трех сортов клюквы крупноплодной, каждый из которых был представлен четырьмя различными формами (итого двенадцать образцов) (рис. 2 и 3.). Из полученных нами данных по разделению RAPD-фрагментов видно, что биоанализатор не уступает по своей разрешающей способности 2 % агарозному гелю в диапазоне длин фрагментов от 50 до 1500 п.о. Фрагменты, длина которых превышает 1500 п.о., с помощью использованного нами набора реагентов разделяются несколько хуже, чем при электрофоретическом разделении в агарозном геле. Однако для нашей работы это не является серьезным недостатком, так как ПЦР-фрагменты длинее 1500 п.о. обладают невысокой воспроизводимостью и поэтому, как правило, не учитываются при маркировании.



**Рис. 1.** Электрофореграмма и таблица с количественными данными, отражающие разделение ISSR-фрагментов, полученных при амплификации ДНК клюквы сорта Пилгрим (Pilgrim). ИФ – интенсивность флуоресценции (в условных единицах).

Обладая высокой чувствительностью детекции, биоанализатор способен фиксировать даже очень небольшие количества ДНК. Благодаря этому в ячейку достаточно наносить всего лишь 1 мкл ПЦР продукта, что в 10 раз меньше объема пробы, обычно наносимого на агарозный электрофорез при последующем окрашивании бромистым этидием.

Использование внутренних маркеров позволяет легко сопоставлять результаты разделения разных проб и точно определять, имеют ли два фраг-

мента в разных пробах одинаковую или различную длину. При разделении же фрагментов в геле с этим могут возникать определенные трудности, связанные с неоднородностью геля, разной напряженностью электрического поля в разных точках и другими факторами. При этом одинаковые фрагменты на разных дорожках могут различаться по своей подвижности.

Использование биоанализатора позволяет значительно уменьшить время, затрачиваемое на анализ, так как, во-первых, само разделение 12

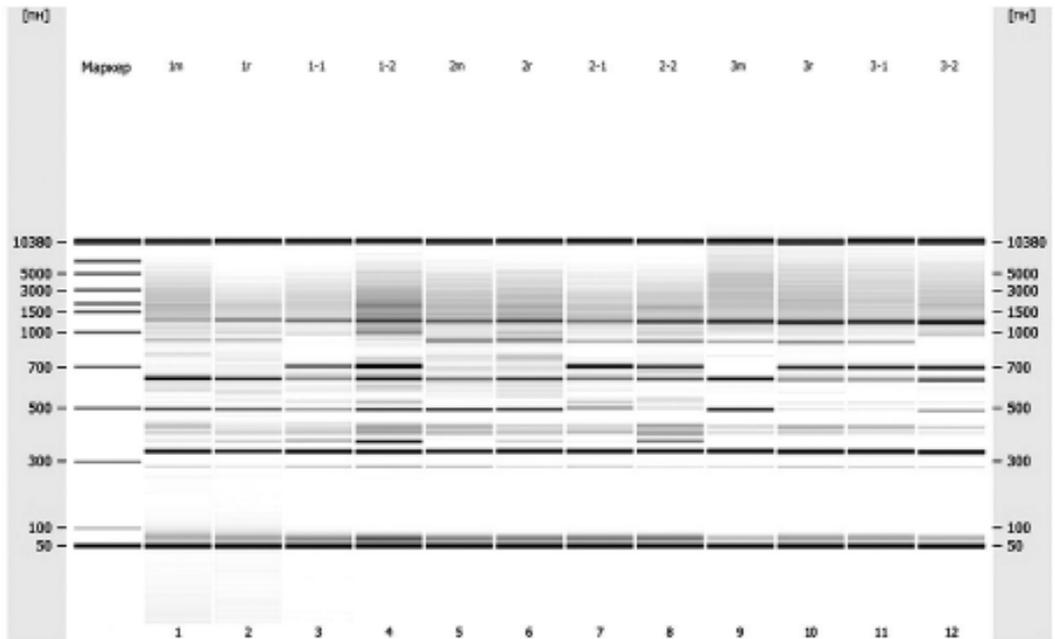


Рис. 2. Пример разделения ISSR-ампликонов с помощью биоанализатора Agilent 2100

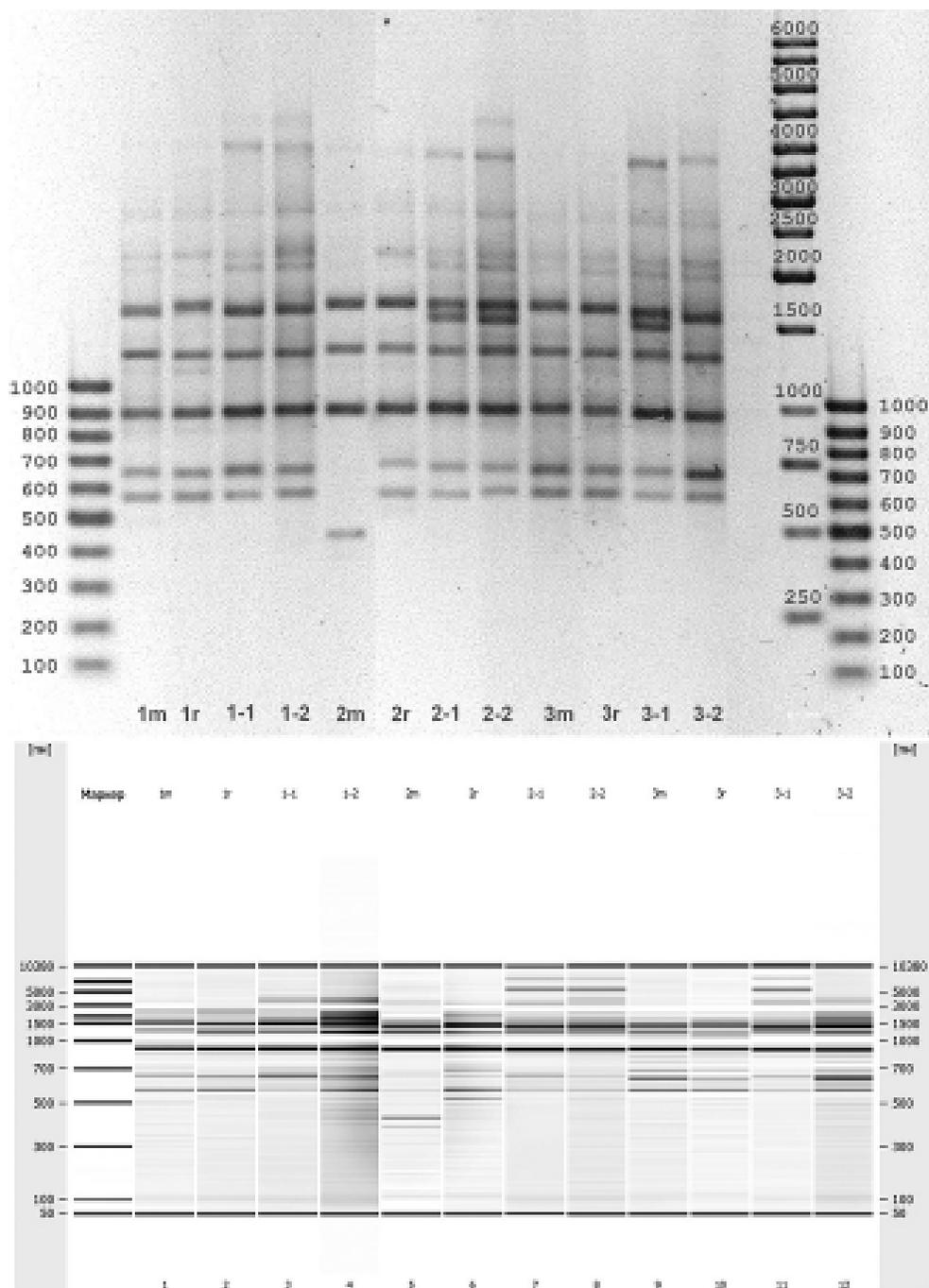
проб занимает всего один час с учетом подготовки чипа, что меньше, чем в случае электрофореза в агарозном геле, а во-вторых, биоанализатор дает возможность исключить такие этапы, как фиксация и окрашивание геля, его фотографирование и обработка полученного изображения. А тот факт, что интегрирование полученных электрофореграм происходит по единым критериям для всех образцов, позволяет устранить элемент субъективности при оценке наличия того или иного фрагмента.

Полученные данные могут быть представлены не только в более привычном напоминающем изображение геля виде, но и в виде электрофореграммы. В некоторых случаях это может оказаться более удобным: например, если сложно определить, представлен ли бенд одним фрагментом в

высокой концентрации или двумя близкими по размеру фрагментами. К тому же, программа позволяет сравнивать электрофореграммы для разных образцов путем наложения, а также автоматически рассчитывает размер и концентрацию фрагментов ДНК. Все это в значительной мере облегчает и ускоряет анализ полученных данных.

### Выводы

Биоанализатор Agilent 2100 является очень удобным инструментом при проведении работ по молекулярно-генетическому маркированию. Он позволяет быстро и с достаточно высоким разрешением разделять фрагменты ДНК, а также автоматически проводит анализ полученных данных, фиксируя наличие фрагментов и определяя их размер и концентрацию.



**Рис. 3.** Сравнение разделения RAPD-ампликонов методом электрофореза в 2% агарозном геле (верхняя часть рисунка) и с помощью биоанализатора Agilent 2100 (нижняя часть рисунка)

### **Список литературы**

1. *Spooner D., van Treuren R. and de Vicente M.C.* Molecular markers for gene bank management // IPGRI technical bulletin. – 2005 – N. 10. – P. 136.
2. *Debnath S.C.* An assessment of the genetic diversity within a collection of wild cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) clones with RAPD-PCR // Gen. Res. Crop Evol. – 2007. – Vol. 54. – P. 509–517.

*Представлена Л.Л. Лукаш  
Поступила 8.10.2008*

### **ЗАСТОСУВАННЯ БІОАНАЛІЗАТОРА AGILENT 2100 У РОБОТАХ З МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНОЇ ПАСПОРТИЗАЦІЇ БІОЛОГІЧНИХ ОБ'ЄКТІВ**

*В.С. Панкратов, А.Н. Юхимук,  
В.Л. Філіпеня, Е.В. Спірідович*

ДНУ “Центральний ботанічний сад НАН  
Білорусі”  
Білорусь, 220012, м. Мінськ, вул. Сургано-  
ва, 2В  
e-mail: spiridovich@cbg.basnet.by

У статті дано характеристику приладу біо-  
аналізатор Agilent 2100, описано його  
принцип роботи й зазначено його переваги  
в порівнянні з електрофоретичним поді-

лом фрагментів ДНК в агарозному гелі.  
Обговорюються можливості застосування  
біоаналізатора в роботах з молекулярно-  
генетичного маркування біологічних (зок-  
рема ботанічних) об'єктів.

*Ключові слова: біоаналізатор, молекуляр-  
но-генетичне маркування, RAPD і ISSR  
маркери.*

### **APPLICATION OF BIOANALYZER AGILENT 2100 FOR MOLECULAR-GENETIC FINGERPRINTING OF BIOLOGICAL OBJECTS**

*V.S.Pankratov, A.N. Uhimchuk,  
V.L. Filipenya, E.V.Spiridovich*

Central Botanical Garden of the NAS of  
Belarus  
Belarus, 220012, Minsk, Surganova str., 2B  
e-mail: spiridovich@cbg.basnet.by

A characteristic to Bioanalyzer Agilent 2100  
is given. Its operating principle is described  
and its advantages are compared with  
agarose gel electrophoresis separation of  
DNA fragments are mentioned. Possibilities  
of using Bioanalyzer in studies involving  
genetic fingerprinting is discussed.

*Key words: Bioanalyzer, molecular-genetic  
marking, RAPD-and ISSR-markers.*