

МРНТИ 14.34.01

МИКРОСАТЕЛЛИТТІК ТАЛДАУ ӘДІСІ НЕГІЗІНДЕ БИОЛОГ СТУДЕНТТЕРДІҢ ҒЫЛЫМИ-ЗЕРТТЕУШІЛІК ҚҰЗЫРЕТТІЛІГІН ҚАЛЫПТАСТЫРУ

Д.М. Мукашева¹, Р.Қ. Жексембиев², Е.А. Кішібаев³

¹3-ші курс докторанты, 6D011300-Биология,

^{1,2,3} Қазақ ұлттық қыздар педагогикалық университеті, Алматы қ., Қазақстан

²б.ғ.к., профессор,

³б.ғ.к., қауымд. профессор м.а.,

email: danagul.mukasheva.84@mail.ru

Бұл мақалада биология мамандығының студенттеріне арналған микросателлиттік талдау жұмыстарын жүргізудің әдістемесі берілген. Терең теориялық білім мен практиканы ұштастыра отырып, микросателлиттік талдау әдістерін жүзеге асыруда қолданылатын жабдықтар мен реактивтер және оларды қолданудың әдіс-тәсілдерін игеруге зертханалық сабақтарда жағдай жасау арқылы, оны іске асыру барысында биолог студенттердің ғылыми-зерттеушілік құзыреттілігін дамытуға болады. Биолог мамандарға молекулалық деңгейде заманауи құрал-жабдықтармен эксперименттік жұмыс істеу әдістерін игеру, қолдану, талдау, синтездеу, зерттеу жұмыстарын жүргізу арқылы ел экономикасын жаңғырту мақсатында жаңа өнімдер ұсыну және функционалдық сауаттылықты дамыту факторлары әркімнің алға басуына сөзсіз қажетті алғышарттардың санатында. Сол себепті осы аталған факторларды іске асыру мақсатында микросателлиттік талдау жұмыстарын меңгерудің маңызы зор. Жаңа мазмұн тудыру үшін элементтерді болжау әрі шығармашылықпен біріктіру, өз тәжірибесі негізінде жаңа модель (құрылым) құрастыруға бағытталған білім беру - қазіргі заманғы өзекті тапсырмалардың бірі.

Түйін сөздер: ДНҚ, қант құмайы, сынама, полимеразды тізбекті реакция (ПТР), праймер

Қазіргі таңда жеке адам ғана емес, тұтас халықтың өзі бәсекелік қабілет арттырса ғана табысқа жетуге мүмкіндік алады.

Бәсекелік қабілет дегеніміз – ұлттық аймақтық немесе жаһандық нарықта бағасы, я болмаса сапасы жөнінен өзгелерден ұтымды дүние ұсына алуы. Бұл материалдық өнім ғана емес, сонымен бірге, білім мен ғылым, қызмет, зияткерлік өнім немесе сапалы еңбек ресурстары болуы мүмкін.

Болашаққа ұлттың табысты болуы оның табиғи байлығымен емес, адамдарының бәсекелік қабілетімен айқындалады. Сондықтан, әрбір қазақстандық, сол арқылы тұтас ұлт ХХІ ғасырға лайықты қасиеттерге ие болуы керек [1].

Соған орай биология мамандығының студенттеріне микросателлиттік талдау жүргізудің әдістемесін игеру ғылымды алға жетелейтіні анық. Микросателлиттік талдау популяциялық зерттеулерде кеңінен қолданылады. Микросателлитті талдау деп ДНҚ-ның белгілі бір бөліктеріндегі микросателлиттік локустар деп аталатын ДНҚ-ның қысқа тандемді қайталанымдарының санын анықтау деп түсіндіріледі. Микросателлиттерде қайталанатын сарын (мотив) ұзындығы 1-9 п.н. (жиірек 2-4 п.н.). Әдісті жүзеге асыру үшін зертханалық жабдықтардың бірнеше түрлері (ДНҚ бөлу жабдығы, ДНҚ-амплификатор, электрофоретикалық жабдық), ал реактивтерден тек қана арнайы праймерлер және ПТР (полимеразды тізбекті реакция) үшін, сондай-ақ ПААГ (полиакриламидті гель) электрофорезі үшін басқа да реактивтер қажет. Талдау кезінде әдіс салыстырмалы түрде қымбат емес, дегенмен нақты бір түр үшін праймерлерді әзірлеу кезінде, уақыт және қаражат шығындары едәуір көп бөлінеді. Алайда көптеген ағаш өсімдіктері үшін, праймерлерді сол тектердің басқа түрлерінен бейімдеуге болады, ал көптеген

митохондриялды және хлоропласты фрагменттер үшін бірнеше тұқымдастардың немесе реттіктердің өкілдерінде қолданылатын әмбебап праймерлер бар.

Локустардың үлкен саны (яғни тәуелсіз маркерлер), сондай-ақ жоғары өзгергіштік, аллельдердің үлкен санының болуы, кодоминанттылық - микросателлиттік талдаудың артықшылығы болып табылады. Кемшіліктері – нақты бір түр үшін арнайы маркерлерді әзірлеу кезінде праймерлердің қымбат болуы. Секвенаторды пайдаланғанда мультиплекс кезінде (бір реакциядағы бірнеше локустардың ПТР-амплификациясы) микросателлиттер барынша тиімді, алайда орташа форматтағы қарапайым электрофоретикалық жабдықтарда да (мысалы, 20-ға 20 см) және бромды этидиймен УК бояуын немесе SYBR-Gold класындағы заманауи бояуларды пайдаланумен, немесе күміс бояумен секвенирлеуге арналған камерада талдануы да мүмкін. Микросателлиттерді талдау кезінде, сондай-ақ «нөл-аллельдер» проблемасы (праймердің қыздыру аймағында мутация кезінде амплификацияның болмауы), сондай-ақ соның салдарынан ұзындығы бойынша бірдей фрагменттердің әртүрлі құрылымы болуы мүмкін, күрделі (жетілмеген) қайталанымдар проблемасы бар екенін де ескеру қажет. Жоғары өзгергіштігі мен полиаллельдігіне байланысты, микросателлиттер салыстырылатын топтардың жуық арадағы дивергенциясы кезінде қолдану үшін, сондай-ақ жеке дарактар мен клондарды сәйкестендіру үшін де ұсынылады [2, 3].

Жабдықтар мен реактивтер. Жалпы жабдықтар: мұздатқыш камералар (-20⁰С-тан -80⁰С дейін), тоңазытқыштар (+4⁰С), үдете салқындату жүйелері, дистиллятор, мұз жасайтын құрылғы, рН-метр, зертханалық таразылар, центрифуга салқындатылумен (13000 айналым/мин дейін), магниттік араластырғыштар, мұзды монша, қатты денелі термостат 99⁰С дейін, ротатор, миницентрифуга/вортекс, су-ағынды сорғы, ламинар-бокс, автоматтық пипеткалар – микродозаторлар (5 – 1000 мкл).

Арнайы жабдықтар: ДНҚ-амплификатор, ПААГ-тағы (полиакриламидті гель) тік электрофорез үшін камералар (спейсерлер, тарақшалар, құю үстелшелері бар қосымша комплектілер), тұрақты тоқ көздері.

Зертханалық ыдыстар: көлемдері әртүрлі зертханалық стақандар (шыны немесе пластикалық), көлемдері әртүрлі өлшеуіш цилиндрлер (шыны немесе пластикалық), ерітінділерді сақтауға арналған күнгірт шөлмектер мен сауытшалар, бояу үшін кюветтер.

Шығын материалдары: микродозаторлардың ұштары, бірреттік пластик түтіктер (1,5 және 0,6 мл), қағаз салфеткалар, пластикалық пакеттер, соның ішінде сыдырма ілгекті.

Басқасы: түтіктерге арналған штативтер, қайшылар, қалақшалар (шпатель), іскектер (пинцет), қандауыр пышақтар (скальпель) және басқалары. Ұлпаларды гомогенизациялауға арналған үккіштер келсапшасымен немесе түрлі жүйедегі гомогенизаторлар, латексті қорғаныш қолғаптар, ультракүлгін сәулесінен қорғайтын көзілдіріктер, далалық жағдайда материал жинау үшін тоңазытқыш-сөмкелер, кескіндемелерді графикалық тіркеудің және талдаудың жүйелері, Трансиллюминатор, гельдерді құжаттандыру жүйесі, компьютер + электрофореграмманы талдау үшін компьютерлік бағдарламалық жасақтама.

Реактивтер: реактивтер тізімі ДНҚ-ны бөліп алу тәсіліне байланысты өзгеруі мүмкін.
ДНҚ-ны микросателлиттік талдауға арналған реактивтер тізімі және буферлер құрамы:

Аммоний ацетаты / Ацетат аммония / Ammonium acetate 7.5 М раствор

Этил спирті / Спирт этиловый 96 ° и 80 °

Изопропил спирті / Спирт изопропиловый

Поливинилпирролидон (PVP 10000)

В-меркаптоэтанол

Акриламид 2К / Acrylamide 2K

N,N-метиленбисакриламид / N,N-methylene – bisacrylamide

N,N,N',N' - тетраметилэтилендиамин (TEMED) / N,N,N',N' - Tetramethylethylenediamine (TEMED)

Аммоний персульфаты / Персульфат аммония (ПСА) / Ammonium Persulphate (PSA)

Трис (гидроксиметил) – аминометан / Trizma base (Tris (hydroxymethyl) - aminomethane

Динатрий тұзы / ЕДТА динатриевая соль / EDTA Disodium salt (EDTA Na₂)

Бор қышқылы / Борная кислота / Boric acid

Бром этидий / Бромистый этидий / Etidium Bromide (исходный раствор 10 мг/мл)

Үлгілерді алу және сақтау: ДНҚ-ны бөліп алу үшін, жақында жиналған және зертханалық жағдайларда сақтауда тұрған дәндер, вегетативті бүршіктер, тұқымдар (гаплоидті эндоспермнің және диплоидты ұрықтардың ұлпалары) сияқты түрлі ұлпалар пайдаланылуы мүмкін.

Қант құмайы дақылдарының тұқымдары $+4^{\circ}\text{C}$ температурада тоңазытқышта, вегетативті ұлпалардың үлгілері – $T = -70^{\circ}\text{C}$ -та немесе бөлме температурасында силикагельдің аз мөлшері бар пакеттерде кептірілген күйде сақталады. ДНҚ-ны бөліп алғанда ұлпаның типін ескеру керек, себебі ескі вегетативті мүшелерде (мысалы, тұқым) екіншілік метаболиттердің көп мөлшері болады. Ұлпаларды таңдауға сәйкес ДНҚ-ны бөліп алудың әртүрлі қаттамаларын пайдаланады.

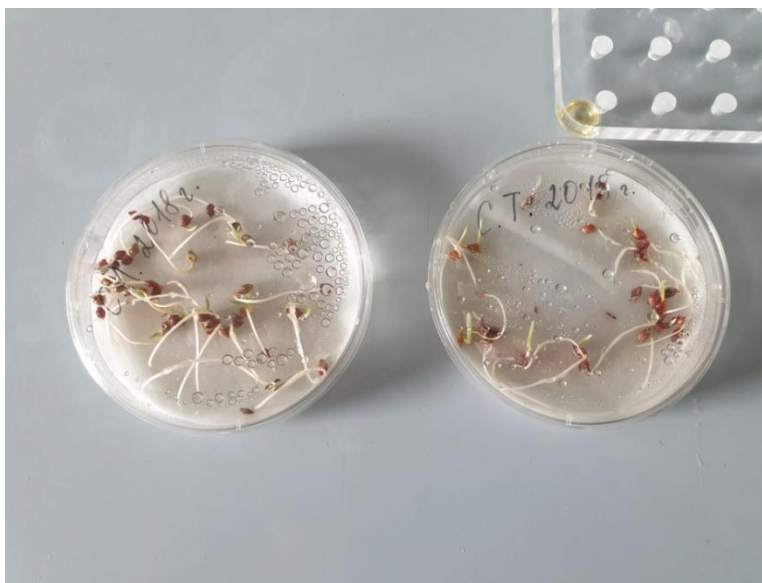
ДНҚ-ны бөліп алу әдісі:

Қант құмайы дақылдарының вегетативті бүршіктерінен немесе тұқымдарынан ДНҚ-ны бөліп алу әдісі.

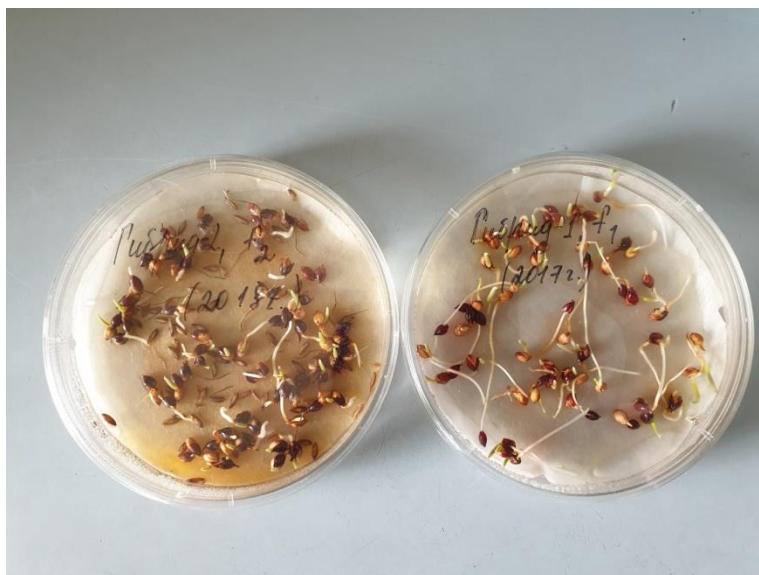
Геномдық ДНҚ-ны бөлу әдістері өсімдіктердің молекулалық биологиясын зерттеу үшін маңызды болып табылады.

Бірінші күні:

1. Әрбір сынаманы дайындау үшін бір эндоспермді немесе тұқымның ұрығын немесе 4-6 вегетативті бүршіктерді (қант құмайы дақылдарының) немесе әр үлгіден бір вегетативті бүршік алдық (сурет 1,2). Түтіктерге қант құмайының вегетативті бүршіктерін жеке бөліп алып, 700 мкл. 2% - СТАВ (Cetyltrimethylammoniumbromid) буферлік қоспаға салып, термостатқа 65°C қыздырдық. Содан кейін ұлпаларды гомогенизатор келсапшасымен ұнтақтап, бір түнге қойып қойдық (2 сағатқа да қояға болады). Дистилденген суда шыны келсапшаны жуып, таза салфеткемен сүртіп, барлық сынамалар үшін қайталанып тұруы керек. 2% - СТАВ (Cetyltrimethylammoniumbromid) буфері – дән немесе өскіндердің қаттылығын жою үшін қолданылады. Әр сынаманы тиісті маркерлік жазуы бар көлемі 1,5 мл жеке түтіктерге салдық.



Сурет – 1. Қант құмайының вегетативті бүршіктері (Судандық шөп, 2018 ж.)



Сурет – 2. Қант құмайының вегетативті бүршіктері (Гибрид-2, (F₂) 2017-2018ж.)

Екінші күні:

2. Термостаттан алғаннан кейін 5 мин. бөлме температурасында суытамыз. Әр түтікке 800 мкл хлороформ құйдық. Хлороформ ДНҚ-ны сындыратындықтан қатты шайқаймау керек.

1. RS-24. Biosan. – ротаторына пробирканы салып 20 минут араластырдық (сурет – 3).



Сурет – 3. RS-24. Biosan. – ротаторында түтіктерді араластыру барысы.

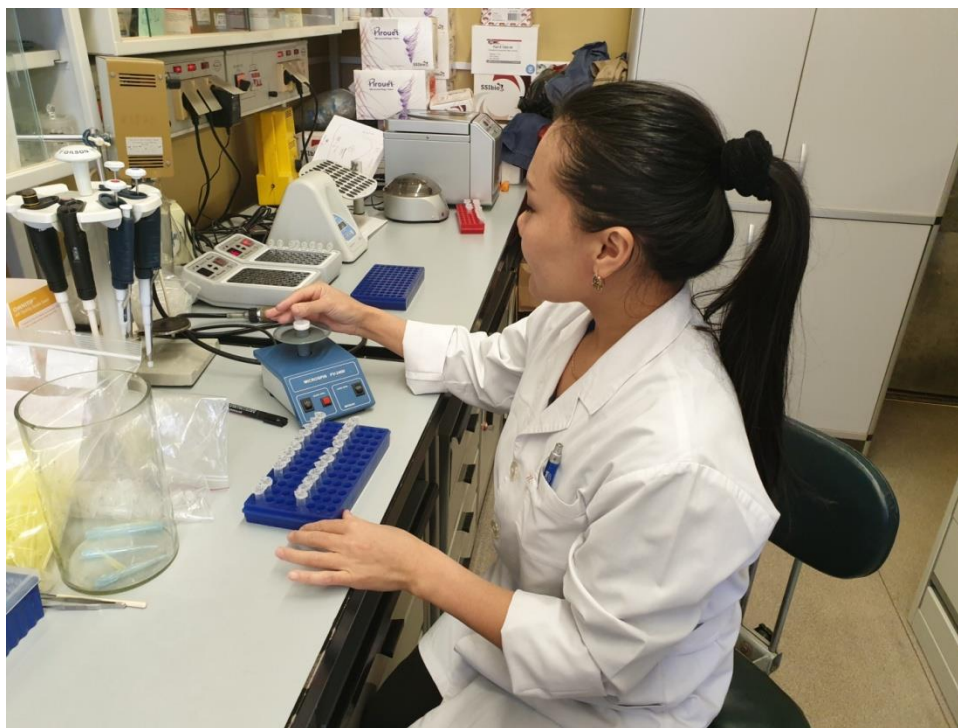
2. Қоспасы бар түтіктерді «Центриф. – Mikro-200, Hettich-Zentrifugen». Центрифугасында 10 минут 5000 айналымда центрифугаладық.
3. Центрифугадан шайқамай алып, сақина жолақты тұнбаға тигізбей интерфазаны қалдырдық, бетіндегі сақина жолаққа дейінгі мөлдір ерітіндіні, яғни, мөлдір супернатантты автоматтық пипетканың көмегімен абайлап алып, тұтастай таза түтіктерге ауыстырдық. Мөлдір супернатант – 600 мклдей болады. Түтіктердің қақпағы жөнді жабылды ма, тексеріп тұрған абзал. Ескі түтіктерді тастаймыз.



Сурет – 4. Супернатант

4. Қоспаға алынған супернатанттың 0,2 бөлігі мөлшерінде 5% СТАВ буферін қостық (120 мкл – 5% СТАВ). Жоғары және төмен төңкеру арқылы араластырамыз.
5. 65⁰С температурада түтіктерді 10 мин бойы термостаттадық. «Термостат – Термит. ДНК-технология».
6. Қоспаға хлороформның тең көлемін қостық. Хлороформ – ұшқыш зат. Сол себепті қоспа термостаттан алынған соң, бөлме температурасында суу керек, сосын барып хлороформ (800 мкл) құямыз. Хлороформды белокты ДНК-дан бөліп алу үшін қолданамыз.
7. Ротаторда 10 мин араластырдық.
8. Сынамаларды 5000 айналыммен 10 мин бойы центрифугаладық. Центрифуга - «Mikro-200. Hettich Zentrifugen»
9. Супернатантты жаңа түтіктерге ауыстырдық. (Супернатант көлемі - 600 мкл) Центрифугадан шайқамай алып, сақина жолақты тұнбаға тигізбей интерфазаны қалдырдық, бетіндегі сақина жолаққа дейінгі мөлдір ерітіндіні, яғни, мөлдір супернатантты автоматтық пипетканың көмегімен абайлап алып, тұтастай таза түтіктерге ауыстырдық.
10. Преципитацияға (шөгу процесі) арналған 2 немесе 1,5 көлемде ДНК-ны тұнбаға түсіру үшін буфер (900 мкл) құямыз. Қоспа пробирканың жоғарғы жолағына дейін болу керек. Қоспа кейде 1000 мкл қамтиды.
11. Түтіктерді 5-10 рет төңкеру арқылы түтіктердің ішіндегі қоспаны араластырдық және бөлме температурасында бір түн бойы қалдырдық.
Үшінші күні:
12. Сынамаларды 10 000 айналыммен 30 мин бойы центрифугаладық.
13. Абайлап, тұнбаға тигізбей, су-ағынды сорғымен супернатантты алып тастадық.
14. Тұнбаны еріту үшін түтіктерге HS-TE буферін (400 мкл) құйдық, шайқауға болмайды, 5-10 минут 65° С термостаттадық.
15. Термостаттан алып, бөлме температурасына дейін суығанда 800 мкл 96° - этанол құйып, түтіктерді 5-10 рет төңкеру арқылы түтіктердің ішіндегі қоспаны араластырдық.

16. (-20° С) мұздатқышқа кемінде 1 сағатқа қойдық (мұздатқышта бір түн қалдыруға болады). Мұздатқыштан алғаннан кейін тез арада сынамаларды салқындатылған центрифугада +4°С температурада минутына 10 000 айналыммен 10 минут бойы центрифугаладық. Центрифуга - «Centrifuge 5415 R- erpendorf». Салқындатқышымен центрифуганы қолданып болғаннан соң, өшіріп қою керек, немесе бетін жауып қою керек, себебі бөлмені суытып, двигателі жанып кетеді.
17. Су-ағынды сорғының көмегімен супернатантты тұнбаға тигізбей абайлап алып тастадық. Тұнбаны 65° С термостатта кептірдік. Тұнба тез кебу үшін түтіктердің қақпағын ашып қойған дұрыс.
18. Әрбір пробиркаға 200 мкл mQ-H₂O құйдық, қоспаны толық гомогенді жағдайға дейін вортексте мұқият араластырдық. Үстіне 100 мкл NH₄ – ацетатын құйдық (сурет – 5).



Сурет – 5. Вортекспен жұмыс істеу барысы

19. 20-30 мин мұз моншасына қойдық.
20. Мұз моншасынан алғаннан кейін тез арада сынамаларды салқындатылған центрифугада +4°С температурасына минутына 13 000 айналыммен 10 минут бойы центрифугаладық.
21. Супернатантты жаңа түтіктерге ауыстырдық. ДНК – осы кезде ерітіндіде болады. Түтіктердің түбіндегі тұнбаны қалдырамыз. Тұнбаға тигізбей автоматтық пипетканың көмегімен супернатантты абайлап аламыз. Керек емес тұздар тұнбаға түсуі ықтимал. Супернатант 300 мкл болады.
22. Преципитацияға (шөгу) арналған 2 немесе 1,5 көлемде ДНК-ны тұнбаға түсіру үшін буфер (900 мкл) құямыз. Қоспа түтіктің жоғарғы жолағына дейін болу керек. Қоспа кейде 1000 мкл қамтиды.
23. Қоспаның 2 көлемінде 96° - этанол (600 мкл) құйдық.
24. 1 сағатқа (бір түнге қоюға болады) мұздатқышқа (-20° С) қойдық.
25. Мұздатқыштан ала салысымен сынамаларды салқындатылған центрифугада +4°С температурасында минутына 13 000 айналыммен 10 минут бойы центрифугаладық.
26. Су-ағынды сорғының көмегімен супернатантты тұнбаға тигізбей абайлап алып тастадық.

27. Әр түтіктегі тұнбаға 100 мкл 80° спирт құямыз.
28. 10 000 айналыммен 5 минут бойы центрифугаладық.
29. Су-ағынды сорғының көмегімен супернатантты тұнбаға тигізбей абайлап алып тастадық. Тұнбаны 65° С термостатта кептірдік. Тұнбаны еріту үшін әр түтікке 100 мкл mQ-H₂O құямыз.
30. Алынған препараттарды 5-10 рет төңкеру арқылы араластырып, (-20° С) мұздатқышқа қойдық. ДНҚ препараты дайын [4].

Бір адам 100 сынаманы 100 мин ішінде өңдей алатын әдістер де бар. Ол үшін ДНҚ-ны бөліп алуға қолданылатын СТАВ буферін дайындау керек. 1000 мл СТАВ буфері үшін: 26 г СТАВ, 130 мл 1М Tris-HCl pH-8,0, 52,65 г натрий хлориді, 26 мл 0,5 м ЭДТА (этилендиаминтетрасірке қышқылы) ерітінділерін алып, автоклавтайды, қолданар алдында 2-5% β-меркаптоэтанол қосады. Алынған үлгіні біркелкі езу үшін 3 мм болаттан жасалған тот баспайтын шариктерден тұратын көлемі 2 мл болатын микроцентрифугалық түтіктер қолданылады. Осы қаттаманы қолдана отырып, уақытты үнемдеуге және жоғары өнімді ДНҚ бөліп алуға болады. Әр үлгі үшін шамамен 0,05 доллар қаржы кетеді және ол әртүрлі өсімдіктерден, соның ішінде *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana benthamiana*, қызанақ, қырыққабат, бидай, жүгері, соя, арпа, күріш сияқты дақылдардан ДНҚ-ны сәтті бөліп алу үшін қолданылған. Сонымен қатар, полисахаридтердің, полифенолдық қосылыстардың, илік заттардың және алкалоидтардың өте жоғары деңгейін қамтитын ұлпалардан геномдық ДНҚ – ны алу кезінде де осы әдісті қолдану тиімді екенін көрсеткен.

Әдістің тиімділігі бастапқы материалдың аз мөлшерін ғана қажет етеді, одан да маңыздысы, үлгіні ластаудан тиімді қорғайды. ДНҚ-ны жуу, шаю және тазарту кезінде өсімдік ұлпасына арналған микроцентрифуганың түтіктерін пайдаланады. Үлгіні ұсақтау кезінде де аз мөлшерде сұйық азотты тұтынады. Әдісте салыстырмалы түрде аз мөлшерде химиялық реактивтер пайдаланылады, буферлі экстракция процесі кезінде де бөлу 100 мин. қамтиды. СТАВ негізінде ДНҚ-ны бөліп алу қымбат емес, оңай орындалатын, жоғары өнімді, қауіпсіз, жылдам және тиімді, үлгілердің өзара ластануын болдырмайды. Бұл әдіс түрлі өсімдіктер үшін тиімді және қымбат реактивтерді қажет етпейді [5].

Микросателлиттік маркерлер. Полимеразды тізбекті реакция және ПТР-дің шарттарын оңтайландыру үшін праймерлерді тандау микросателлиттік талдаудың маңызды кезеңі болып табылады. Микросателлиттік тізбектерді амплификациялау үшін праймерлерді әзірлеу үнемі және қарқынды түрде жүргізіледі. Қолда бар әлемдік әдебиетті талдау өсімдіктердің әрбір түрінің генетикалық өзгергіштігін талдау үшін оңтайлы көптеген микросателлиттік локустарды іріктеп алуға мүмкіндік береді. Өсімдіктердің генетикалық өзгергіштігін талдау үшін микросателлиттік локустардың ПТР режимдерінің сипаттамалары кестеге толтырылады. Кестеде Локус, Праймердің реттілігі (5' – 3'), Мотив, Қыздыру температурасы, °С, Циклдер саны көрсетілуі тиіс.

ПТР-ді дайындау және жүргізу. Қант құмайы дақылдарының микросателлиттік локустарын амплификациялау үшін GenePak® PCR Core («Лаборатория Изоген» ЖШҰ) реагенттерінің дайын жиынтығы пайдаланылады. Реагенттер жиынтығы «ыстық сөре» үшін ингибирленген Taq-ДНК-полимераза, дезоксинуклеозидтрифосфаттар және тиісінше, соңғы концентрациясы 1U, 200 мкМ және 2,5 мМ магний хлориді, сондай-ақ бір стандартты ПТР-ді (PCR diluent) жүргізу үшін оңтайландырылған буферлік жүйесі бар түтіктердегі (пробиркалардағы) лиофилденген құрғақ қоспалар (МастерМикс) болып табылады.

Қоспаны жинау және ПТР-ді жүргізу:

1. Тоталды (тұтас) ДНҚ-ны 50-100 нг/мкл концентрациясына дейін ерітіңіз.
2. Амплификацияға арналған (МастерМикс) қоспасы бар түтікке 0,1-0,5 мкМ ұсынылатын соңғы концентрациясында зерттелетін локус үшін айрықша праймерлердің 5 мкл қоспасын қосыңыз (тура және кері).
3. Түтікке 10 мкл ПТР-еріткішін (PCR diluent) қосыңыз.
4. Түтікке 5 мкл зерттелетін ДНҚ-ны қосыңыз. Егер амплификация термореттеусіз қақпағы бар термоблокта жүргізілсе (амплификатордың құрылымына байланысты), онда түтікке қоспаның булануын болғызбас үшін шамамен 20 мкл минералды май қосу керек.

5. Түтіктерді бағдарламаланатын термостаттың термоблогына апарыңыз және амплификацияның тиісті бағдарламасын іске қосыңыз.
6. Реакция аяқталғаннан кейін ПТР өнімімен түтіктерді электрофорез жүргізгенге дейін тоназытқышта, немесе одан ұзақ уақытқа -20°C -та сақтайды.

ДНҚ-ның амплифицирленген фрагменттерін электрофоретикалық бөлу. ДНҚ-ның амплифицирленген фрагменттерін электрофоретикалық бөлу тік электрофорезге арналған камераларда полиакриламидті гельде (мысалы, «Хеликон» ЖШҰ шығарған VE – 20) қуат көздерінің комплектісімен (Мысалы, «НПФ ДНҚ-Технология» ЖАҚ шығарған «Эльф-4») жүргізіледі. Стандартты ұзындықтардың маркері ретінде Нае III немесе Нра I рестриктазамен өңделген pBr322 плазмиданың ДНҚ-сы пайдаланылады. 20-базалық арнайы ДНҚ-маркер молекулалық массаның баламалы маркері болып қызмет атқара алады [5].

Камераларды құру және гелдерді дайындау. Полиакриламидті гелді (ПААГ) дайындау кезінде 30% АКА-1000 мл., 10х ТЕБ-1000 мл., 10% ПСА-10 мл., Бромистый этидий-1000 мл. ерітінділер пайдаланылады. Гельдегі акриламидтің соңғы концентрациясы 6%-ды құрайды. Ерітінділермен жұмысты қолғаппен жүргізу керек. Мысалда ерітінділердің «Хеликон» ЖШҚ шығарған, шынысының (эйнек) көлемі 20 x 20 см VE – 20 бір стандартты камерасына есептеулері келтірілген.

1. Гельдерді құюға арналған шыныны бүйірлерінен спейсерлермен, ал төменнен – төртке бүктелген сүзгіш қағаздың жіңішке жолағымен төсеп, жұптастырып қойыңыз. Осындай «Сэндвичті» бүйірінен қысқыштармен бекітеді.
2. Шыныларды құю үстеліне тігінен орнатады.
3. Гельді құю үшін қоспаны дайындайды: 100 мл өлшеуіш цилиндрге 10 мл TBE x10 ерітіндісін, 20 мл 30% АКА ерітіндісін құяды. Көлемін 100 мл-ге жеткізеді. Ішіндегісін стаканға құйып, оны магнитті араластырғышқа орнатады. Тұрақты араластыра отырып 100 мкл ТЕМЕД-ті қосады.
4. Кішкентай стаканға 20 мл негізгі қоспаны құяды. 50 мкл ТЕМЕД-ті қосып, магнитті араластырғышта араластырады, 250 мкл 10% ПСА ерітіндісін қосады. Тез араластыру керек және дереу қоспаны екі «сэндвич» арасында тең бөліп, төменгі жиегінен 1,5-2,5 см биіктікке гелді тығынды құяды.
5. *Ескерту: *ТЕМЕД пен ПСА-ның мөлшері жоғары болғандықтан, тығын үшін гель қоспасы өте тез полимерленеді!!!*
6. Тығын полимерлегеннен кейін (3-5 минут) негізгі қоспаға 670 мкл 10%-ПСА ерітіндісін қосады. Араластырады. Қоспаны екі «сэндвичке» де құяды.
7. Әйнектің ойығы бар жоғарғы шеті мен тарақша тістерінің жоғарғы шеті арасында шағын саңылау (2 мм-ге жуық) қалдыра отырып, ұяшықтарды қалыптастыруға арналған тарақшаларды сұйық қоспасы бар «сэндвичтерге» салады.
8. Гельді жарықта, бөлме температурасында 30 минуттан кем емес полимерлеу керек.
9. Гельдерді полимерлегеннен кейін камераны нұсқаулыққа сәйкес жинайды.
10. Камераны (төменгі, содан кейін жоғарғы бөліктерін) 1 : 20 қатынасында бастапқыдан dH₂O-мен араластырылған TBE электродты буферімен толтырады. Электродты буфер бірнеше рет пайдаланылуы мүмкін.
11. Шприцті немесе жіңішке ұштығы бар пипетканы пайдаланып, абайлап тарақшаларды шығарады, акриламидтің полимерленуі нәтижесінде пайда болған ауа көпіршіктерінен, гель бөліктерінен және судан ұяшықтарды электродты буфермен жуады.

Үлгілерді полиакриламидті гелге түсіру. ПТР үшін стандартты қоспа өзінің құрамында бромфенолды көк бояғышты қамтиды, бұл гелге түсіру және сынамалардың гелдегі жылжуын бақылау процесін айтарлықтай жеңілдетеді.

1. Зерттелетін ПТР-өнімнің 3 мкл жіңішке ұштығы бар микропипеткаға сорып алады.
2. Пипетканың тұмсығының ұшын, оны сыртқы шыныға сәл қысыңқырап, ұяшыққа батырады және сынаманы алады.
3. Пипетканың ұштығын электродты буфермен жуып, қағаз салфеткамен сүртеді.

4. Әрбір геледе фрагменттер ұзындығын бақылау маркерін түсіру үшін, геледің шеттерінен және олардың арасында тең қашықтықтарда 2 бос ұяшықты қалдыра отырып, 1.-3.-ші тармақтарды барлық үлгілер үшін қайталайды.
5. 2-3 мкл-ден фрагменттер ұзындықтарының маркерін қосады [7] .

Электрофоретикалық бөлу.

1. Камераны электродтары бар қақпақпен жабады.
2. Электродтарды тұрақты тоқтың қуат көзіне қосады.
3. Қуат көзін қосу керек. Амплификация өнімдерін электрофоретикалық бөлуді 300 В кернеуде және камераға (2 геле) 110 мА аспайтын ток күшінде 1,5-2,5 сағат бойы жүргізу керек.
4. Бромфенол көктің жолағының жылжуы бойынша сынамалардың жүріс жолын бақылайды.
5. Бояуыштың жолы геле ұзындығының 2/3-не жеткенде, электрофорезді тоқтатады.
6. Қуат көзін өшіреді және камераның қақпағын ашады.
7. Электродты буферді төгеді.

Гельді шешіп алу және бояу.

1. Электрофорез біткеннен соң камераны бөліктерге бұзады.
2. Қысқыштарды көлденең жағдайда «сэндвичтердің» бірінен алып тастайды. Жоғарғы (ішкі) шыныны шешеді. Қағаз тығыннан геледің төменгі шетін шпательмен кеседі.
3. Сумен суланған қолғаппен геледі қолмен абайлап алып, оны бояу үшін кюветке апарады. Екінші геледі де осылай алады.
4. Гельдерді бір рет дистилденген сумен жуып, бромды этидий ерітіндісін құяды 3-5 минут жүргізу керек.
Ескерту: *бромды этидий көп рет қолданылатындықтан, бояу уақыты ерітіндінің «ескіруіне» байланысты өзгеріп, 10-15 минутқа жетуі мүмкін.*
5. Бояп біткеннен кейін бромды этидий ерітіндісін сақтауға арналған шөлмекке абайлап құю керек.
6. Кюветтегі гелдер 4-6 рет су құбырының суымен және бір рет дистилденген сумен жуылады.

Электрофорез нәтижелерін визуалдау (көру) және құжаттау. Бөліну өнімдерін визуалдау және құжаттау ультракүлгін жарықта трансиллюминатордың, және қорғаныш күңгірт қаппен тиісті бағдарламалық жабдықталуы бар компьютерге, немесе бейнені ұстап қалуға арналған сыртқы терминалға қосылған цифрлық фотоаппарат кіретін геле-құжаттау жүйесінің көмегімен жүргізеді [6].

Электрофорез нәтижелерін ПААГ-та визуалдау.

1. Геледі кюветтен алып, трансиллюминатор терезесінің суланған бетіне қояды. Барлық қыртыстар мен бүктемелерді жазады.
2. Қорғаныш қақпақтың терезесін жабады. Трансиллюминатордың УК-шамдарын қосады.
3. Бейнені компьютерлік бағдарлама арқылы ұстап қалады.
4. Бейнені қатты дискіде немесе басқа тасымалдаушыда сақтайды.

Нәтижелерді оқу және жазып алу. Алынған бейнелер әртүрлі дарақтардың микросателлиттік фрагменттерінің ұзындығы бойынша (қайталаулар саны) өзгергіштігін көрсетеді. Электрофорез нәтижелерін фрагменттер ұзындығы түрінде (нуклеотидтер жұптарында) оқиды және хаттамаларға түсіреді. Көплокусты генотиптер әрбір дарақтың жеке генетикалық портретін көрсетеді.

Фрагменттердің ұзындығын оқу, оны белгілі маркерлік фрагменттердің ұзындығымен салыстыра отырып, фрагменттің ұзындығын (молекулалық салмағын) автоматты түрде анықтауға мүмкіндік беретін арнайы бағдарламалық жабдықтауды пайдалану арқылы жүргізеді [2].

Жас мамандарға жұмысқа орналасу қазіргі кезде елеулі мәселелердің бірі, себебі еңбек нарығындағы жоғары бәсекелестікке байланысты ең тәжірибелі, білікті, қабілетті және өз саласын жетік білетін іскер мамандар ғана жоғары ақы төленетін жұмыс орындарында қызмет атқара алады. Қоғамда жас мамандардың білімі мен тәжірибесінің жеткіліксіз деңгейі экономикалық

дағдарыстар мен еңбек нарығындағы елеулі өзгерістерге әкеледі. Сол себепті білім беру жүйесін жаңғырту аясында ғалымдардың назары бәсекеге қабілетті маманды қалыптастыру мәселесін шешу [7]. Молекулалық деңгейде зертханалық жұмыстарды жетік білген биолог мамандардың ғылым жолындағы жетістіктері үлкен мәселелерді шешеді деген үміттеміз. Олай болса, республика жоғары оқу орындарының алдында жан-жақты дамыған, саяси сауатты, терең теориялық біліммен қаруланған, игерілген зерттеушілік білімдер мен біліктерді шынайы практикада қолдана алатын, адамдармен қарым-қатынас мәдениетін меңгерген маман дайындау міндеті тұр.

Пайдаланылған әдебиеттер

1. Назарбаев Н.Ә. Болашаққа бағдар: рухани жаңғыру. Астана, 2017. – 5-11 б.
2. Политов Д.В., Белоконов М.М., Белоконов Ю.С. Анализ полиморфизма аллозимов И ДНК хвойных. Методическое пособие к практикуму «Анализ полиморфизма аллозимов и ДНК на примере основных лесобразующих пород». Москва – 2011.
3. Ильинов А.А., Топчиева Л.В., Раевский Б.В. Использование микросателлитных маркеров в изучении генофонда ели финской *Picea x Fennica* (Regel) Ком. в Карелии.
4. Калаева В.Н., Землянухина О.А., Карпеченко И.Ю., Карпеченко К.А., Кондратьева А.М., Вепринцев В.Н., Карпеченко Н.А., Карпова С.С. Разработка метода получения препарата суммарной ДНК высокого качества из растений рода *Rhododendron* // Научный журнал – Фундаментальная исследования. – 2012. -№ 5-1. – с. 148-152.
5. Deshui Yu, Ju Zhang, Guangxuan Tan, Ningshu Yu, Qiuyue Wang, Qiqi Duan, Xin Qi, Mingjiao Cheng, Chunxue Yan, Zhangkun Wei, Zhenmiao Yu, Wenchao Huang, Chengwei Li. An Easily-performed High-throughput Method for Plant Genomic DNA Extraction. *Analytical Biochemistry. Methods in the Biological Sciences*. 19 January 2019.
6. Потокина Е.К., Орлова Л.В., Вишневская М.С., Алексеева Е.А., Потокин А.Ф., Егоров А.А. Генетическая дифференциация популяций ели на Северо-Западе России по результатам маркирования микросателлитных локусов // Экологическая генетика. Том X. №2. 2012.
7. Стручкова И.В., Калысова Е.А. Теоретические и практические основы проведения электрофореза белков в полиакриламидном геле. Электронное учебно-методическое пособие. Нижний Новгород. 2012.
8. Резник С.Д., Сочилова А.А. Личная конкурентоспособность студента вуза: Система и механизмы. Известия Пензенского Государственного педагогического университета им. В.Г.Белинского. Общественные науки. №24. 2011.

ФОРМИРОВАНИЕ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ КОМПЕТЕНЦИИ СТУДЕНТОВ – БИОЛОГОВ НА ОСНОВЕ МЕТОДА МИКРОСАТЕЛЛИТНОГО АНАЛИЗА

Д.М. Мукашева¹, Р.К. Жексембиев², Е.А. Кирибаев³

¹PhD 3 курс, 6D011300-Биология,

²к.б.н., профессор, ³к.б.н., и.о. ассоц. профессор,

^{1,2,3} Казахский государственный женский педагогический университет, г. Алматы, Казахстан,
email: danagul.mukasheva.84@mail.ru

В данной статье для студентов-биологов представлена методика проведения микросателлитного анализа. Совмещение научной теории и практики и создание условий для использования оборудования, реактивов и методов их применения при выполнении микросателлитного анализа во время лабораторных занятий способствует формированию научно-исследовательской компетенции у специалистов-биологов. Освоение методов выполнения экспериментальной работы при помощи современного оборудования на молекулярном уровне, применение, анализ, синтезирование, предложение новой продукции посредством выполнения исследовательских работ в целях модернизации экономики страны, также факторы повышения функциональной грамотности, бесспорно, являются для студентов-биологов необходимыми предпосылками их развития. Поэтому в целях реализации вышеперечисленных факторов очень важно освоить микросателлитный анализ. Предопределение новых элементов для создания нового содержания и их связь с

творчеством, образование, направленное на создание новой модели (структуры) с опорой на личный опыт, на сегодняшний день является одной из главных задач.

Ключевые слова: ДНК, сахарное сорго, проба, полимеразная цепная реакция (ПЦР), праймер

FORMATION SCIENTIFIC AND RESEARCH COMPETENCE OF BIOLOGY STUDENTS ON THE BASE OF MICROSATELLITE ANALYSIS METHOD

D.M. Mukasheva¹, R.K. Zhexembiyev², Ye.A. Kirshibayev³

¹PhD student in specialty 6D011300-Biology,

²Cand. Sci. (Biology), Professor,

³ Cand. Sci. (Biology), Acting Associate Professor

^{1,2,3} Kazakh National Women's Teacher Training University, Almaty, Kazakhstan

email: danagul.mukasheva.84@mail.ru

The technique of carrying out microsatellite analysis designed for biology students is presented in this article. Combining scientific theory and practice and creating conditions for use the equipment and reactants in laboratory classes as well as methods of their use at implementation microsatellite analysis advantages to develop research competence of biology experts. Mastering methods of conducting experimental work by means of modern equipment at the molecular level, application, analysis, synthesizing, offering new products by performing researches for the purpose of national economy modernization, also factors of increasing functional literacy undoubtedly are thought to be necessary prerequisites for biology students development. Therefore, in order to implement the above mentioned factors is very important to master microsatellite analysis. Predetermination of new elements for generation new contents and their connection with creativity, education directed on creation new model (structure) based on personal experience is believed to be one of the main tasks today.

Key words: DNA, sugar sorghum, probe, polymerase chain reaction (PCR), primer.

Редакцияға 10.08.2019 қабылданды