



NC – отрицательный контроль, PC – положительный контроль,  
1-12 – ДНК пшеницы после ПЦР со специфическими к DREB3 праймерами

**Рисунок 1** – Результаты электрофоретического разделения продуктов полимеразной цепной реакции

Тем не менее, для подтверждения правильной работы гена необходимо в будущем провести дополнительные исследования по определению белкового продукта гена, определению уровня синтеза регулируемых этим транскрипционным фактором белков, а также устойчивость или восприимчивость полученных растений к абиотическим и биотическим стрессам.

#### Литература

- 1 Lata C., Prasad M. Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants // Journal of Experimental Botany. – 2011 – V. 62, No. 14. – P. 4731-4748.
- 2 Mizoi J., Shinozaki K., Yamaguchi K. AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses // Biochimica et Biophysica Acta. – 2012. – 1819. – P. 86-96.
- 3 Agarwal P., Agarwal P., Reddy M., Sopory S. Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants // Plant Cell Reports. – 2006. – 25. P. 1263 – 1274.
- 4 Wang J. et al. Induced Expression of DREB Transcription Factor and Study on Its Physiological Effects of Drought Tolerance in Transgenic Wheat // Acta Genetica Sinica. – 2006. – 33(5). – P. 468-476.
- 5 Islam M.S., Wang M.H. Expression of dehydration responsive element-binding protein-3 (DREB3) under different abiotic stresses in tomato // BMB reports/ - 2009. – P. 611-616.
- 6 Zhao T. et al. Genome-wide analysis and expression profiling of the DREB transcription factor gene family in Malus under abiotic stress // Molecular Genetic Genomics.- 2012. – No 287. - P.423-436.
- 7 Sazegari S., Niazi A. Isolation and molecular characterization of wheat (Triticum aestivum) Dehydration Responsive Element Binding Factor (DREB) isoforms // Australian Journal of Crop Science.- 2012.- 6 (6) – P. 1037-1044
- 8 Ismagul A., Iskakova G., Harris J., Eliby S. Biolistic Transformation of Wheat with Centrophenoxine as a Synthetic Auxin // Methods in Molecular Biology: Crop Breeding. -2013. - Humana Press, Springer.

УДК 577.113: 577.217

Д.А. Мухамедьяров, Ж.А. Куламетов, М.С. Калимкулова, И.А. Ахметоллаев\*

Национальный центр биотехнологии, г. Астана, Казахстан

\*e-mail: [iliyas@mail.ru](mailto:iliyas@mail.ru)

#### Синтез модифицированных олигонуклеотидов для идентификации микросателлитных локусов крупного рогатого скота

Микросателлитные ДНК технологии, основанные на флуоресцентно-модифицированных олигонуклеотидах, на сегодняшний день являются наиболее информативными и эффективно применяемыми в популяционной и эволюционной биологии, геномном картировании и определении родства между видами и популяциями. В ходе проведенной работы нами были модифицированы по 5' концу 4 праймера для локусов BM1818, BM1824, BM2113 и CSRM60. Праймеры связанные с азидами флуоресцентных родаминов были очищены от свободных олигонуклеотидов и несвязанного флуоресцентного реагента на колонке C18 в системе ВЭЖХ. Полученные с помощью хроматографии фракции праймеров проанализированы по длине волны эмиссии флуоресцентного родамина.

**Ключевые слова:** олигонуклеотиды, флуоресцентные метки, синтез, микросателлиты.

D.A. Mukhamedyarov, Z.A. Kulametov, M.S. Kalimkulova, I.A. Akhmetollaev

### **Synthesis of the modified primers for identification of microsatellite loci of a horned cattle**

Today microsatellite DNA technologies, which based of fluorescent-modified oligonucleotides, are be most informing and effective applying in population and evolutionary biology, genomic mapping and relationship between types and populations. We modified 4 primers for BM1818, BM1824, BM2113 и CSRM60 loci. Primers, which connected with azids of fluorescent rhodamines, were cleared from free primers and not bound fluorescent reagent on C18 column in HPLC system. Fractions of primers, which received by means of a HPLC, were analyzed on length of a wave of emission of fluorescent rhodamine.

**Keywords:** oligonucleotides, fluorescent labels, synthesis, microsatellites.

Д.А. Мухамедьяров, Ж.А. Куламетов, М.С. Калимкулова, И.А. Ахметоллаев

### **Ірі мүйізді малдың микросателлиті локустар бірдейлестіру үшін модификацияланған олигонуклеотидтердің синтезі**

Қазіргі таңда, түрлерді және популяцияларды геномды картілеу және туыстығын анықтау барысында популяциялық және эволюциялық биологияда флуоресцентті-модификацияланған олигонуклеотидтер негізінде микросателлитті ДНК технологиялары өте информативті және тиімді. Жұмыс жүргізу барысында біз BM1818, BM 1824, BM2113 және CSRM60 праймерлерін 5' соңынан модифицирленді. Азидті флуоресцентті родаминдермен қосылған праймерлер бос олигонуклеотидтерден және қосылмаған флуоресцентті реагентпен C18 колонкасында ЖТСХ жүйесінде тазаланды. Хроматография фракциясы арқылы алынған праймерлер фракциясы флуоресцентті родамин эмиссиясының толқын ұзындығы арқылы анализденді.

**Түйінк сөздер:** олигонуклеотидтер, флуоресценттік белгі, синтез, микросателлиттер

Микросателлиты представляют собой tandemно-повторяющиеся элементы генома, состоящие из одного и до 6 пар оснований, способные образовывать достаточно протяженные кластеры, до 60 и более повторов. Микросателлитные последовательности ДНК в последнее время играют доминирующую роль в качестве неисчерпаемого источника генетических маркеров. В настоящее время выделено и описано более 2000 микросателлитов в геноме крупного рогатого скота (база данных INRA, Франция) и их количество увеличивается с каждым днем. Микросателлиты имеют ряд преимуществ перед другими маркирующими системами: они множественны, высокополиморфны, широко распространены по всем хромосомам, легко выявляются и идентифицируются. В 1996 году Международным обществом генетиков (ISAG) было рекомендовано использование микросателлитных локусов ДНК для определения достоверности происхождения крупного рогатого скота. С открытием микросателлитов появилась возможность осуществить маркировку некоторых генетических локусов, связанных с продуктивностью [1-11].

Одним из основных способов анализа микросателлитных маркеров является мультилокусное разделение ампликонов в капиллярном анализаторе, с использованием дифференциальной детекции флуоресцентных красителей связанных с праймерами. В настоящее время наиболее распространенной реакцией, используемой в модификации олигонуклеотидов, является реакция связывания аминов с активированными сукцинимидными и сульфосукцинимидными эфирами. При всей простоте, этот подход имеет недостатки, связанные с неустойчивостью активированных эфиров в водной среде и зависимости хода реакции от pH, а также растворимости активированного эфира. Альтернативой этому может служить подход, основанный на диполярном присоединении азидов к терминальным ацетиленам в присутствии ионов меди, получивший название "click chemistry" [12].

В нашей работе мы проводим синтез и модификацию праймеров к микросателлитным локусам BM1818, BM1824, BM2113 и CSRM60 с помощью технологии "click chemistry".

### **Материалы и методы**

Олигонуклеотидные последовательности синтезировали на приборе ASM 800 фирмы Биоссет (Россия) фосфоаммидным методом согласно Инструкции фирмы-производителя. Аммолиз праймеров проводили в 25% растворе аммиака при комнатной температуре.

Полученные олигонуклеотиды анализировали в денатурирующем 20%-ном ПААГе как описано в статье [13].

Модификацию полученных праймеров осуществляли с помощью набора реагентов от фирмы Lumiprobe Corporation (Lumiprobe LTD) по 5' концу праймера. Для модификации олигонуклеотидов использовались азиды родамина 110 (535нм), родамина 6G (555 нм), тетраметилродамина (585нм) и 5-карбоксихродамина (610нм) [12].