

УДК 631.52 : 543.545.577.21

КАПИЛЛЯРНЫЙ ФРАГМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ ДНК В СЕЛЕКЦИИ РАСТЕНИЙ (обзорная)

© 2024 Н.В. Гулаева, А.Л. Бакунов, С.Л. Рубцов, А.В. Милехин, А.А. Вязовой, Н.Н. Дмитриева

Самарский федеральный исследовательский центр РАН,
Самарский научно-исследовательский институт сельского хозяйства им. Н.М. Тулайкова,
Самарская область, пгт Безенчук, Россия

Статья поступила в редакцию 14.03.2024

Использование в селекционных программах современных методов исследования позволяет в кратчайшие сроки достичь высоких результатов, что особенно актуально в условиях современной внешнеполитической обстановки для обеспечения продовольственной безопасности нашей страны. Фрагментный анализ ДНК методом капиллярного гель - электрофореза является эффективным инструментом изучения структуры и анализа ДНК, имеющим множество областей применения, в частности для различных генетических исследований в селекции растений и сельском хозяйстве. Анализ фрагментов ДНК позволяет решать множество задач, включая генетическую экспертизу и паспортизацию сортов ряда важнейших сельскохозяйственных культур, аутентификацию клеточных линий, определение эффективности редактирования CRISPR-Cas9, анализ микросателлитных маркеров, мультиплексный анализ лиганд-зависимой амплификации зондов (MLPA), генотипирование SNP, выявление анеуплоидии и многое другое. Хотя технологии секвенирования также позволяют применять эти методы, исследователи выбирают фрагментный анализ, поскольку он быстрее выполняется и имеет более высокую чувствительность и разрешение, а также является более экономичным методом благодаря возможности мультиплексирования.

Ключевые слова: Фрагментный анализ ДНК, электрофорез, ДНК, паспортизация, генотипирование SNP, микросателлитный анализ, мультиплексная лигазная цепная реакция, размерный стандарт, аллельная лестница.

DOI: 10.37313/2782-6562-2024-3-1-19-25

EDN: RAAHRR

ВВЕДЕНИЕ

Для успешного решения селекционных задач особое значение приобретают современные молекулярно-генетические методы и новые знания, как в области структурной организации геномов, так и в изучении механизмов регуляции экспрессии важнейших генов с/х культур [8, 11, 19].

Гулаева Надежда Васильевна, научный сотрудник лаборатории селекции перспективного генетического материала и молекулярно-генетических и физиологических исследований. E-mail: gulaewapw@mail.ru

Бакунов Алексей Львович, кандидат сельскохозяйственных наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биотехнологии сельскохозяйственных растений.

E-mail: bac24@yandex.ru

Рубцов Сергей Леонидович, кандидат сельскохозяйственных наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биотехнологии сельскохозяйственных растений.

E-mail: rubcov_sl@mail.ru

Милехин Алексей Викторович, кандидат сельскохозяйственных наук, заведующий лабораторией биотехнологии сельскохозяйственных растений.

E-mail: alekseimilehin@mail.ru

Вязовой Артём Алексеевич, инженер-исследователь лаборатории биотехнологии сельскохозяйственных растений.

E-mail: artioo11201@gmail.com

Дмитриева Надежда Николаевна, научный сотрудник лаборатории биотехнологии сельскохозяйственных растений. E-mail: dmitrievanad55@yandex.ru

В настоящее время одно из центральных мест среди методов исследования белков и нуклеиновых кислот занимает Электрофорез. Его применяют для аналитической оценки таких параметров ДНК, как примерная длина молекул, качество и количество препарата. Электрофорез в агарозном и полиакриламидном гелях позволяет разделять фрагменты ДНК длиной до 500 нуклеотидов, отличающиеся между собой всего на несколько нуклеотидов.

Помимо «обычного» электрофореза в пластине из геля, в современных условиях используют капиллярный электрофорез (КЭ), который проводят в очень тонкой трубочке, наполненной гелем (обычно полиакриламидным). Разрешающая способность такого электрофореза значительно выше: максимальная анализируемая длина фрагмента ДНК составляет примерно 1200 нуклеотидов, к тому же с его помощью можно разделять молекулы ДНК, отличающиеся по длине всего на один нуклеотид. Благодаря высокой точности и относительной простоте постановки реакции, фрагментный анализ ДНК методом капиллярного гель - электрофореза становится эффективным инструментом изучения структуры и анализа ДНК, имеющим множество областей применения, в частности для различных генетических исследований в селекции растений и сельском хозяйстве.

История развития метода капиллярного электрофореза

Основные закономерности электрофореза (как движения заряженных частиц в электрическом поле в среде электролита) были известны уже в конце XIX века. Впервые явление электрофореза было открыто профессорами Московского университета П.И. Страховым и Ф.Ф. Рейсом в 1807 году. Впоследствии шведский биохимик Арне Тиселиус в 1926 году выпустил в свет работу, в которой описал трубку из кварца U-образной формы, разработанную для электрофореза, затем в 1930 году материал трубки был заменен на хлорид серебра. В 1936 году, благодаря наличию хорошей базы исследовательских и экспериментальных работ, был разработан первый аппарат для электрофореза [12, 28, 40].

Метод капиллярного электрофореза появился относительно недавно. Первые упоминания о нем относятся к концу семидесятых годов XX века. В 1981 году Лукач К. Д. и Йоргенсен Д. У. первыми продемонстрировали возможности капиллярного электрофореза, основанного на физическом методе анализа, при котором происходит миграция внутри капилляра заряженных частиц определяемых веществ, растворенных в растворе электролита, под влиянием постоянного электрического поля [24, 25].

В восьмидесятые годы были созданы и запущены в серийное производство первые приборы - автоматические секвенаторы, которые существенно повысили удобство проведения электрофореза и его разрешающую способность. В девяностые годы резко расширилось практическое использование этого метода в аналитических лабораториях мира [1, 26, 30].

Капиллярный электрофорез стал важным и экономически эффективным подходом к изучению нуклеиновых кислот на основе различных методов секвенирования, которое все больше используют для определения последовательности отдельных генов, более крупных генетических областей полных хромосом или целых геномов у различных сельскохозяйственных культур [2, 17, 29].

Классическим и наиболее распространенным методом секвенирования ДНК, основанным на принципе капиллярного электрофореза, стал метод Сэнгера, основанный на регистрации флуоресценции терминальных ддНТФ у проходящих через детектор молекул [37]. Анализ данных капиллярного секвенирования по сути сводится к прочтению последовательностей пиков флуоресценции. В настоящее время с использованием современных автоматических секвенаторов длина одного прочтения (рида) по методу Сэнгера составляет 800-1000 нуклеотидов [10, 15, 31].

Данный метод в свою очередь послужил основной платформой для разработки современных высокопроизводительных систем секвенирования («NGS» или секвенирование второго поколения) [4, 3, 15].

Создание автоматических секвенаторов настолько упростило и удешевило процесс определения последовательности ДНК, что с середины 1980-х годов один за другим стали появляться проекты по полногеномному секвенированию различных сельскохозяйственных культур и накоплению огромного количества генетической информации в различных специализированных базах данных. Появились новые возможности для определения химического строения генов и их расположения на хромосомах, а также пониманию основных механизмов наследования и регуляции признаков культурных растений со сложной генетической детерминацией (количественные признаки, «QTL») [20, 35].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалами работы являлись публикации в специализированных изданиях и интернет-источниках в период с 1977 по 2023 год. В работе использованы сравнение (эмпирический метод), анализ и синтез (комплексно-комбинированные методы).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Области применения капиллярного фрагментного анализа в селекции растений:

-Генотипирование растений с помощью различных типов молекулярных маркеров. Одним из примеров может служить генетическое типирование коротких tandemных повторов. Обычно их амплифицируют с использованием флуоресцентно-меченного прямого и немеченого обратного праймеров методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Продукты ПЦР разделяют по размеру при помощи капиллярного гелевого электрофореза [5, 13, 14].

Также эта технология применяется в SNP генотипировании (исследовании однонуклеотидного полиморфизма). Маркер для определения полиморфизма одиночных нуклеотидов (Single Nucleotide Polymorphism) состоит из отдельных пар оснований, варьирующих в известной последовательности ДНК, так, что формируется до 4 вариантов данного маркера [9, 17, 18, 19].

-Генетическая экспертиза и паспортизация сортов. 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 выяв-

лять большое аллельное разнообразие среди исследуемых образцов и устанавливать различия между ними [9, 16].

-Фингерпринтинг - полиморфизм длин фрагментов, полученных путем ферментативной рестрикции и ПЦР, позволяет создать уникальный профиль (fingerprinnt), по которому различают образцы разной ДНК. ДНК фингерпринтинг позволяет с высокой точностью определять степень генетической гетерогенности близкородственных групп фитопатогенов. Метод представляет собой комбинацию фрагментации геномной ДНК и ПЦР [22, 32].

-SNaPshot – гибридная технология, включающая в себя элементы секвенирования и фрагментного анализа. В основе метода - технология секвенирования единичного нуклеотида (single base extension). Возможность одновременной детекции до 10 и более SNPs. Основные направления технологии SNaPshot: генотипирование SNP и точечных мутаций, а также анализ метилирования ДНК [39].

-Относительная количественная оценка флуоресценции (RFQ) — это метод, используемый в различных приложениях для анализа фрагментов для сравнения высоты пиков между образцами. Для сравнения различий в одном и том же маркере по нескольким образцам могут быть использованы высота пика или площадь пика. Данный метод применим как при анализе анеуплоидии, так и при диагностике крупных хромосомных делеций (скрининг на потерю гетерозиготности (LOH) с использованием микросателлитов или однонуклеотидных полиморфизмов) [15, 16, 21].

-Метод MLPA и (Multiplex ligation-dependant probe amplification). Мультиплексная лигазная цепная реакция (MLPA) – это молекулярно-генетический метод определения относительного количества копий определенных участков ДНК. Данная технология позволяет детектировать делеции и дупликации экзонов, целых генов или протяженных участков хромосом, а также, определять число хромосом (анеуплоидии). За одну реакцию возможно определить количество копий до 50 различных участков ДНК (экзонов в одном гене или генов в определенном хромосомном локусе) [39, 41].

Таким образом, наряду с современными методами секвенирования ДНК, КЭ является важной частью изучения структуры и функционирования ценных генов с/х культур, в частности с его помощью можно проводить следующие генетические исследования:

- Идентификация Аллелей;
- Анализ мутаций;
- Анализ экспрессии генов;
- Генотипирование;
- Количественный и качественный анализ

библиотек для NGS и нанопорового секвенирования;

- Анализ фрагментированности геномной ДНК;
- Анализ внеклеточной ДНК;
- Анализ олигонуклеотидов;
- Анализ продуктов рестриктазного расщепления;
- Оценка целостности РНК (RNA Quality Number).

Общие принципы действия капиллярного геля - электрофореза

Капиллярный гель-электрофорез представляет собой процесс разделения ионизованных отрицательно заряженных фрагментов ДНК по размеру в среде полимера (геля), молекулы которого по размеру больше, либо сопоставимы с размером разделяемых фрагментов ДНК. [6, 7, 36].

Причина, по которой электрофорез работает, связана с одним из фундаментальных уравнений физики электромагнетизма: сила равна электрическому заряду, умноженному на напряженность поля в данной точке. Это принимает вид: $F = qE$;

Где F = сила, q = электрический заряд и E = напряженность электрического поля.

Это уравнение подразумевает, что чем выше заряд частицы, тем сильнее сила, возникающая в результате приложения данного электрического поля. Это означает, что две частицы одинаковой массы, но разного заряда будут перемещаться в поле с разной скоростью. Кроме того, скорость, с которой движется любая заряженная молекула, зависит от отношения ее заряда к массе. В совокупности эти свойства и взаимосвязи позволяют ученым разделять компоненты важнейших биомолекул, таких как нуклеиновые кислоты, на более мелкие компоненты [23, 27, 33].

Основными компонентами системы являются пробирка с образцом, исходные и целевые флаконы, капилляр, электроды, источник питания высокого напряжения, детектор и устройство вывода данных и обработки данных.

Перед электрофорезом фрагменты ДНК вместе с другими отрицательно заряженными молекулами солей и остатками дезоксирибозидтрифосфатов и праймеров вводятся в капилляр с гелем методом электрокинетической инъекции. Высокое напряжение, приложенное к образцу в капилляре, приводит в движение отрицательно заряженные фрагменты ДНК. В результате электрофореза фрагменты ДНК передвигаются по капилляру в одном направлении (от «-» к «+») и разделяются в геле по соотношению заряд/масса [34, 38].

На электрофоретическую подвижность образца влияют условия проведения анализа: вели-

чина электроосмотического потока, тип буфера, концентрация, кислотность, температура капилляра, приложенное напряжение и используемый тип полимера. Достигая оптического окна вблизи положительного электрода, разделенные по размеру фрагменты ДНК пересекают лазерный луч. Лазерное излучение возбуждает флуоресценцию красителей, которыми помечены концы фрагментов ДНК. Флуоресцентное свечение разделяется на цвета дифракционной решеткой и регистрируется ПЗС камерой. Поскольку при возбуждении лазером различные флуоресцентные красители излучают свет на разных длинах волн, то все, даже совпадающие по размеру фрагменты ДНК, могут быть обнаружены, если они содержат в своем составе отличающиеся по спектру флуоресценции красители. Сигналы флуоресценции оцифровываются в различные хроматограммы, затем эти данные сохраняются в файл в формате, совместимом с программным обеспечением, используемым для анализа. На основании полученных хроматограмм происходит вычисление размера и относительного количества фрагментов ДНК в образцах [5, 23, 35].

Этапы фрагментного анализа

1) Экстракция ДНК с последующим определением ее концентрации и степени чистоты. Для оценки чистоты препарата ДНК проводят измерение оптической плотности раствора при длинах волн 260, 280 и 235 нм, т.е. на максимумах поглощения для ДНК. Значение соотношения $A_{260}/280$ для чистой ДНК должно быть больше 1,8, значение $A_{260}/235$ должно быть больше 2,2.

2) ПЦР амплификация с парой праймеров, в каждой из которых один праймер содержит на 5'-конце флуоресцентный краситель.

3) Подготовка образца для загрузки в прибор: продукт амплификации смешивается с формамидом и размерным стандартом.

4) Разделение флуоресцентно-меченных фрагментов ДНК в генетическом анализаторе методом капиллярного электрофореза с детекцией сигнала флуоресценции, индуцированной лазером.

5) Анализ результатов исследования. С помощью соответствующего программного обеспечения проводится определение размера фрагментов ДНК, определение генотипов на основании соотношения различных аллелей анализируемых маркеров [9, 21, 23].

Преимущества и недостатки капиллярного электрофореза

Преимущества метода:

-Быстрота и высокая производительность, благодаря возможности загрузки 96 образцов и

автоматизации ввода пробы. Большим преимуществом перед традиционными типами электрофореза является то, что все этапы — заливка геля, нанесение образцов, разделение фрагментов, визуализация и анализ результатов проходят в одном приборе и в одну стадию.

-Воспроизводимость. Визуализация, количественный и качественный фрагментный анализ происходит с помощью ПО;

-Точность. Разделение флуоресцентно-меченных фрагментов ДНК в генетическом анализаторе методом КЭ происходит с точностью до одного нуклеотида, что особенно важно при паспортизации сортов сельскохозяйственных культур;

-Получение новых характеристик учета и оценки хозяйственно-ценных признаков (например, относительная количественная оценка флуоресценции);

-Простая подготовка пробы для большинства растительных объектов;

-Низкий расход реактивов и растворителей, а также минимальный объем анализируемого образца;

-Низкая стоимость в расчете единичного анализа;

Недостатки метода:

-Дороговизна

-Необходимость специализированного оборудования реактивов;

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Прогресс в современной селекции растений в значительной степени базируется на развитии и использовании новейших молекулярно-генетических подходов.

Флуоресцентный анализ фрагментов ДНК является одним из самых востребованных методов в современной молекулярной биологии, обладает очень высоким разрешением и воспроизводимостью, измеряет относительный размер фрагментов ДНК посредством капиллярного электрофореза флуоресцентно меченых фрагментов ДНК на автоматическом генетическом анализаторе. Разделение фрагментов ДНК происходит внутри капилляра, заполненного гелем, действующим как молекулярное сито. Молекулы меньшего размера легче проникают в структуру геля и мигрируют быстрее, чем большие, разделение величин с близкими величинами отношения заряда к массе происходит в соответствии с их размерами. Так, методом КЭ по величинам молекулярных масс могут быть разделены различные биологические макромолекулы (например, белки и фрагменты ДНК), часто имеющие близкие величины отношения заряда к массе.

На основании соотношения различных аллелей анализируемых маркеров происходит

определение генотипов и решается множество генетических и в том числе селекционных задач (идентификация аллелей, анализ экспрессии генов, анализ мутаций, генотипирование по различным маркерам и многое другое).

Таким образом, капиллярный фрагментный анализ, на сегодняшний день является важным инструментом изучения генетического материала растений, которым все активнее пользуются современные лаборатории для ускорения селекционного процесса.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бейкер А. Капиллярный электрофорез: монография /А. Бейкер. - Нью-Йорк, 1995. – 265 с.
2. Вулли В, Матис Р.А. Сверхскоростное секвенирование ДНК с использованием чипов для капиллярного электрофореза // Аналитическая химия. - 1995 г. - № 9. - С.78-82.
3. Гаджиев Н.М., Лебедева В.А., Рыбаков Д.А. и др. Использование в практической селекции картофеля результатов ДНК-маркирования исходных родительских форм и межсортовых гибридов // Сельскохозяйственная биология. - 2020. - Т. 55, №5. - С. 981-994.
4. Езерская А.А., Пивовар М.Л. Капиллярный электрофорез: основные принципы, применение в фармацевтическом анализе // Вестник фармации. - 2019. - №1. - с. 35-44.
5. Заруцкий И.В., Манойлов В.В., Самсонова Н.С. и др. Метод поиска пиков размерного стандарта при фрагментном анализе ДНК // Журнал технической физики. - 2018. - т. 88, вып. 9. - С. 1407-1412.
6. Каменцев Я.С., Комарова Н.В. Основы метода капиллярного электрофореза. Аппаратурное оформление и области применения // Аналитика и контроль. - 2002. - Т.6, № 1.
7. Кемп Г. Капиллярный электрофорез: универсальное семейство аналитических методов // Биотехнология и прикладная биохимия. - 1998. - Т.27 (1). - С. 9-17.
8. Корзун В.Н. Разработка и применение геномных технологий для молекулярно-генетического картирования и прикладной селекции зерновых культур: диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук / В.Н. Корзун. - Санкт-Петербург, 2021.
9. Колобова О.С., Малюченко О.П., Шалаева Т.В. и др. Генетическая паспортизация картофеля на основе мультиплексного анализа 10 микросателлитных маркеров // Вавиловский журнал генетики и селекции. - 2017.- Т. 21. - С. 124-127.
10. Краснов Я.М., Гусева Н.П., Шарапова Н.А. и др. Современные методы секвенирования ДНК (ОБЗОР) // Проблемы особо опасных инфекций, вып. 2. - Саратов, 2014. - С. 73-79.
11. Кутлунина Н.А., Ермошин А.А. Молекулярно-генетические методы в исследовании растений / Н.А. Кутлунина, А.А. Ермошин. - Екатеринбург, 2017. - 142 с.
12. Михов Б., Де Грюйтер А. Электрофорез - теория и практика / Б. Михов, А. Де Грюйтер. - 1995. - 405 с.
13. Рамазанова С.А., Савиченко В.Г., Устарханова Э.Г. и др. Поиск новых SSR-локусов ДНК для создания эффективной технологии генотипирования сои // Масличные культуры. - 2021. - № 4 (188). - С. 18-24.
14. Ребриков Д.В. ПЦР в реальном времени / Д.В. Ребриков, Г.А. Саматов, Д.Ю. Трофимов, П.А. Семенов, А.М. Савилова, И.А. Кофиади, Д.Д. Абрамов. -10-е изд.- М.: Лаборатория знаний, 2022. - 223 с.
15. Ребриков Д.В. NGS: высокопроизводительное секвенирование / Д.В. Ребриков, Д.О. Коростин, Е.С. Шубина, В.В. Ильинский.-4-е изд.- М.: Лаборатория знаний, 2021. - 232 с.
16. Савиченко В.Г., Рамазанова С.А. Детекция фрагментов днк при проведении молекулярно-генетической паспортизации СОРТОВ СОИ: 12-я Международная конференция молодых учёных и специалистов / В.Г. Савиченко, С.А. Рамазанова. - ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК, 2023.
17. Степухович А., Цуприк А., Кособокова О. и др. Анализ капиллярно-электрофоретических систем секвенирования ДНК // Журн. технической физики. - 2008. - Т. 78. - С. 90-102.
18. Хавкин Э.Е. Генотипирование картофеля и его дикорастущих сородичей методом полиморфизма микросателлитов. Докл. РАСХН / Э.Е. Хавкин, И.А. Шилов. - 2006. - С. 3-5.
19. Харченко П.Н. ДНК-технологии в развитии агробиологии / П.Н. Харченко, В.И. Глазко. - Москва, 2006. С. 475.
20. Хлесткина Е.К., Шумный В.К., Колчанов Н.А. Маркер-ориентированная селекция и примеры ее использования в мировом картофелеводстве // Достижения науки и техники АПК. -2016. - Т. 30. - № 10. - С. 5-8.
21. Хомов Ю.А., Фокин А.М. Капиллярный электрофорез как высокоэффективный аналитический метод (обзор литературы) // Современные проблемы науки и образования. – 2012. – № 5.
22. Чесноков Ю.В. ДНК-фингерпринтинг и анализ генетического разнообразия у растений // Сельскохозяйственная биология. - 2005. - Т. 40. - № 1. - С. 20-40.
23. Шаллан А. Основные принципы капиллярного электрофореза. Энциклопедия судебной медицины / А. Шаллан, Р. Гайт, М. Бредмор. - 2013. - С. 549-559.
24. Йоргенсон Ю. В., Лукач К.Д. Зонный электрофорез в стеклянных капиллярах с открытыми трубками // Аналитическая химия. - 1981 г. - Т. 53. - С. 1298-1302.
25. Barker D., Bashkin J. Nucl. Acid. Res. // Nature. - 1998. - Vol. 26.- N 11.- P. 2797-2802.
26. Blackburn M.G. Nucleic Acids in Chemistry and Biology // Great Britain: Royal Society of Chemistry. - 2006. - P. 168.
27. Engelhardt H., Beck W., Schmitt T. Capillarelektroforese, Methoden und Möglichkeiten // Wiesbaden: Vieweg Verlag. - 1994. - P. 218.
28. Fiers W., Contreras R., Haegemann G. Capillarelektroforese // Nature. - 1978. - Vol. 273. - N 5658. - P. 113-120.
29. Hyman E.D. A new method of sequencing DNA // Anal. Biochem. -1988. - Vol. 174(2):423-36.
30. Knott T., Marsh M., Bechtol K. Electrophoresis and DNA analysis // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1995. - Vol. 92. - N 10. - P. 4347-4351.

31. Landers J.P. Handbook of Capillary Electrophoresis // Boca Raton, CRC Press. - 1994. - P. 486.
32. Lee L.G., Spurgeon S.L, S.C. Heiner, Benson B.B. DNA analysis in plant breeding // Nucl. Acid. Res. - 1997. - Vol. 25. - N 14. - P. 2816-2822.
33. Mujumdar R.B. Ernst S.R., Lewis C.J. // Bioconjugate Chem. - 1993 Vol. - 4 N 2. - P. 105-111.
34. Nunnally B.K., He H., Li L., Tucke S.A. // Anal. Chem. - 1997. - Vol. 69. - N 13. - P. 2392-2397.
35. Paulus A., Hüskén D. DNA digest analysis with capillary electrophoresis // Jan-Feb. - 1993. - P. 27-35.
36. Rosenblum B.B., Lee L.G., Spurgeon S.L., Khan S.H., Menchen S.M., Heiner C.R., Chen S.M. // Nucl. Acid. Res. - 1997. - Vol. 25. - N 22. - P. 4500-4504.
37. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. - 1977. - Vol. 74. - N 12. - P. 5463 - 5467.
38. Tabor S., Richardson C.A. Proc. Natl. Acad. Sc.i USA. - 1995. - Vol. 92. - N 14. - P. 6339-6343.
39. Taylor G.R., Noble J.S., Mueller R.F. Automated analysis of multiplex microsatellites //Med Genet. - 1994. - Vol. 31. - P. 937-43.
40. Weissman S.M. // Science. 1978. - Vol. 200. - N 4341. P. - 494-502.

CAPILLARY FRAGMENT ANALYSIS OF DNA IN PLANT BREEDING (review)

© 2024 N.V. Gulyaeva, A.L. Bakunov, S.L. Rubtsov, A.V. Melekhin, A.A. Vyazovoy, N.N. Dmitrieva

Branch of the Samara Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences,
Samara Scientific Research Institute of Agriculture named after N.M. Tulaykov,
Samara region, Bezenchuk village, Russia

The use of modern research methods in breeding programs makes it possible to achieve high results in the shortest possible time, which is especially important in the current foreign policy environment to ensure the food security of our country. DNA fragment analysis by capillary gel electrophoresis is an effective tool for studying the structure of DNA, which has many applications, in particular for various genetic studies in plant breeding and agriculture. DNA fragment analysis allows solving a variety of tasks, including genetic examination and certification of varieties of a number of important crops, authentication of cell lines, determination of the effectiveness of CRISPR-Cas9 editing, analysis of microsatellite markers, multiplex analysis of ligand-dependent amplification probes (MLPA), relative fluorescent quantification or quantitative fluorescent PCR (QF-PCR), genotyping SNP, detection of aneuploidy and much more. Although sequencing technologies also allow these methods to be used, researchers choose fragment analysis because it is faster to perform and has higher sensitivity and higher resolution, as well as being a more cost-effective method due to the possibility of multiplexing.

Keywords: DNA fragment analysis, electrophoresis, DNA, certification, SNP genotyping, microsatellite analysis, multiplex ligase chain reaction, dimensional standard, allele ladder.

DOI: 10.37313/2782-6562-2024-3-1-19-25

EDN: RAAHRR

REFERENCES

1. Baker A., Capillary electrophoresis: monograph /A. Baker. - New York, 1995. - 265c.
2. Woolley V, Mathis R.A. Ultra-fast DNA sequencing using chips for capillary electrophoresis // Analytical chemistry. - 1995 - No. 9. - P. 78-82.
3. Gadzhiev N.M., Lebedeva V.A., Rybakov D.A. and et al. The use in practical potato breeding of the results of DNA labeling of the original parent forms and inter-cultivar hybrids // Agricultural Biology. - 2020. - vol. 55, No. 5. - P. 981-994.
4. Ezerskaya A.A., Pivovarov M.L. Capillary electrophoresis: basic principles, application in pharmaceutical analysis // Bulletin of Pharmacy. - 2019. - No. 1. - P. 35-44.
5. Zarutsky I.V., Manoilov V.V., Samsonova N.S., et al. The method of searching for peaks of the dimensional standard in DNA fragment analysis // Journal of Technical Physics. - 2018. - vol. 88, issue 9. - P. 1407-1412.
6. Kamentsev Ya.S., Komarova N.V. Fundamentals of the capillary electrophoresis method. Hardware design and applications // Analytics and control. - 2002. - Vol. 6. - P. 6.
7. Kemp G. Capillary electrophoresis: a universal family of analytical methods // Biotechnology and applied biochemistry. - 1998. - Vol.27 (1). - P. 9-17.
8. Korzun V.N. Development and application of genomic technologies for molecular genetics mapping and applied breeding of grain crops: dissertation for the degree of Doctor of Biological Sciences / V.N. Korzun. - St. Petersburg, 2021.
9. Kolobova O.S., Malyuchenko O.P., Shalaeva T.V. et al. Genetic certification of potatoes based on multiplex analysis of 10 microsatellite markers // Vavilovsky Journal of Genetics and Breeding. - 2017.- Vol. 21. - P. 124-127.
10. Krasnov Ya.M., Guseva N.P., Sharapova N.A., et al. Modern methods of DNA sequencing (REVIEW) // Problems of especially dangerous infections, issue 2. - Saratov, 2014. - P. 73-79.
11. Kutlunina N.A., Ermoshin A.A. Molecular genetics methods in plant research / N.A. Kutlunina, A.A. Ermoshin. - Yekaterinburg, 2017. - 142 p.
12. Mikhov B., De Gruyter A. Electrophoresis - theory and

- practice / B. Mikhov, A. De Gruyter. - 1995. - 405 p.
13. *Ramazanova S.A., Savichenko V.G., Ustarkhanova E.G. and others.* Search for new SSR DNA loci to create an effective soybean genotyping technology // *Oilseeds.* - 2021. - № 4 (188). - P. 18-24.
 14. *Rebrikov D.V.* Real-time PCR / D.V. Rebrikov, G.A. Samatov, D.Yu. Trofimov, P.A. Semenov, A.M. Savilova, I.A. Kofiadi, D.D. Abramov. -10th ed.-M.: Laboratory of Knowledge, 2022. - 223 p.
 15. *Rebrikov D.V.* NGS: high-performance sequencing / D.V. Rebrikov, D.O. Korostin, E.S. Shubina, V.V. Ilyinsky. -4th ed. - Moscow: Laboratory of Knowledge, 2021. - 232 p.
 16. *Savichenko V.G., Ramazanova S.A.* Detection of dna fragments during the molecular genetics certification of SOYBEAN VARIETIES: the 12th International Conference of Young Scientists and Specialists / V.G. Savichenko, S.A. Ramazanova. - FGBNU FNC VNIIMK, 2023.
 17. *Stepukhovich A., Tsuprik A., Kosobokova O., etc.* Analysis of capillary-electrophoretic DNA sequencing systems // *Journal of Technical Physics.* - 2008. - vol. 78. - P. 90-102.
 18. *Khavkin E.E.* Genotyping of potatoes and their wild relatives by microsatellite polymorphism. *Dokl. RASKHN / E.E. Khavkin, I.A. Shilov.* - 2006. - P. 3-5.
 19. *Kharchenko P.N.* DNA technologies in the development of agrobiolgy / P.N. Kharchenko, V.I. Glazko. - Moscow, 2006. P. 473.20.
 20. *Khlestkina E.K., Shumny V.K., Kolchanov N.A.* Marker-oriented breeding and examples of its use in world potato growing // *Achievements of science and technology of the agro-industrial complex.* -2016. - Vol. 30. - No. 10. - P. 5-8.
 21. *Khomov Yu.A., Fokin A.M.* Capillary electrophoresis as a highly effective analytical method (literature review) // *Modern problems of science and education.* - 2012. - № 5.
 22. *Chesnokov Yu.V.* DNA fingerprinting and analysis of genetic diversity in plants // *Agricultural biology.* - 2005. - Vol. 40. - No. 1. - P. 20-40.
 23. *Shallan A.* Basic principles of capillary electrophoresis. *Encyclopedia of Forensic Medicine / A. Shallan, R. Gait, M. Bradmore.* - 2013. - P. 549-559.
 24. *Jorgenson Yu. V., Lukach K.D.* Zone electrophoresis in glass capillaries with open tubes // *Analytical Chemistry.* - 1981 - Vol. 53. - P. 1298-1302.
 25. *Barker D., Bashkin J.* Nucl. Acid. Res. // *Nature.* - 1998. - Vol. 26.- N 11.- P. 2797-2802.
 26. *Blackburn M.G.* Nucleic Acids in Chemistry and Biology // Great Britain: Royal Society of Chemistry. - 2006. - P. 168.
 27. *Engelhardt H., Beck W., Schmitt T.* Capillarelektroforese, Methoden und Möglichkeiten // Wiesbaden: Vieweg Verlag. - 1994. - P. 218.
 28. *Fiers W., Contreras R., Haegemann G.* Capillarelektroforese // *Nature.* - 1978. - Vol. 273. - N 5658. - P. 113-120.
 29. *Hyman E.D.* A new method of DNA sequencing // *Anal. Biochem.* -1988. - Vol. 174(2):423-36.
 30. *Knott T., Marsh M., Bechtol K.* Electrophoresis and DNA analysis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 1995. - Vol. 92. - N 10. - P. 4347-4351.
 31. *Landers J.P.* Handbook of Capillary Electroforesis // Boca Raton, CRC Press. - 1994. - P. 486.
 32. *Lee L.G., Spurgeon S.L, S.C. Heiner, Benson B.B.* DNA analysis in plant breeding // *Nucl. Acid. Res.* - 1997. - Vol. 25. - N 14. - P. 2816-2822.
 33. *Mujumdar R.B. Ernst S.R., Lewis C.J.* // *Bioconjugate Chem.* - 1993 Vol. - 4 N 2. - P. 105-111.
 34. *Nunnally B.K., He H., Li L., Tucke S.A.* // *Anal. Chem.* - 1997. - Vol. 69. - N 13. - P. 2392-2397.
 35. *Paulus A., Hüsklen D.* DNA digest analysis with capillary electrophoresis // *Jan-Feb.* - 1993. - P. 27-35.
 36. *Rosenblum B.B., Lee L.G., Spurgeon S.L., Khan S.H., Menchen S.M., Heiner C.R., Chen S.M.* // *Nucl. Acid. Res.* - 1997. - Vol. 25. - N 22. - P. 4500-4504.
 37. *Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R.* *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* - 1977. - Vol. 74. - N 12. - P. 5463 - 5467.
 38. *Tabor S., Richardson C.A.* *Proc. Natl. Acad. Sc.i USA.* - 1995. - Vol. 92. - N 14. - P. 6339-6343.
 39. *Taylor G.R., Noble J.S., Mueller R.F.* Automated analysis of multiplex microsatellites // *Med Genet.* - 1994. - Vol. 31. - P. 937-43.
 40. *Weissman S.M.* // *Science.* 1978. - Vol. 200. - N 4341. P. - 494-502.

Nadezhda Gulaeva, Research Associate of the Laboratory of Selection of Promising Genetic Material and Molecular-Genetic and Physiological Studies.

E-mail: gulaewanw@mail.ru

Aleksey Bakunov, Candidate of Agricultural Sciences, Leading Research Associate of the Laboratory of Biotechnology of Agricultural Plants. E-mail: bac24@yandex.ru

Sergey Rubtsov, Candidate of Agricultural Sciences, leading research associate of the Laboratory of Biotechnology of Agricultural Plants. E-mail: rubcov_sl@mail.ru

Aleksey Milekhin, Candidate of Agricultural Sciences, Head of the Laboratory of Biotechnology of Agricultural Plants. E-mail: alekseimilehin@mail.ru

Artem Vyazovoy, Research Engineer of the Laboratory of Biotechnology of Agricultural Plants.

E-mail: artioo11201@gmail.com

Nadezhda Dmitrieva, Research Associate of the Laboratory of Biotechnology of Agricultural Plants.

E-mail: dmitrievanad55@yandex.ru