

На правах рукописи

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации  
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
«Федеральный научный центр биологических систем и  
агротехнологий Российской академии наук»  
(ФГБНУ ФНЦ БСТ РАН)

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ  
К ВЫПОЛНЕНИЮ ПРАКТИЧЕСКИХ ЗАНЯТИЙ И ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ**

**ДИСЦИПЛИНЫ**

*«Б1.В.ДВ.02.02 Методы генетических исследований сельскохозяйственных животных»*

Уровень высшего образования

**МАГИСТРАТУРА**

Направление подготовки

**36.04.02 ЗООТЕХНИЯ**

(код и наименование направления подготовки)

**Питание сельскохозяйственных животных и кормопроизводство**  
(наименование направленности (профиля) образовательной программы)

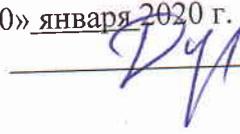
Квалификация

**Магистр**

Методические указания рассмотрены и утверждены на заседании отдела кормления сельскохозяйственных животных и технологии кормов им. проф. С.Г. Леушина

Протокол № 1 от «10» января 2020 г.

Зав. отделом, д.б.н.

 Г.К. Дускаев

Оренбург 2020

**Лабораторные методы исследований в животноводстве:** метод. указания по выполнению лабораторных работ и практических занятий для магистров направления подготовки 36.04.02 Зоотехния /Сост.: доктор мед. наук, профессор С.В. Черкасов // ФГБНУ ФНЦ БСТ РАН. – Оренбург, 2020 – 13 с.

Методические указания по выполнению лабораторных работ и практических занятий составлены в соответствии с программой дисциплины и предназначены для студентов направления подготовки 36.04.02 Зоотехния. Методические указания содержат краткое описание современных инновационных проектов ДНК-технологий в животноводстве, использование ДНК-диагностики для раннего выявления наследственных дефектов у животных, а также современных методов и оборудования для генетического анализа.

## Содержание

ВВЕДЕНИЕ	4
ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ	5
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 1.	9
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 2.	11

## ВВЕДЕНИЕ

Дисциплина «Б1.В.ДВ.02.02 Методы генетических исследований сельскохозяйственных животных» направление подготовки 36.04.02 ЗООТЕХНИЯ, ориентирована на формирование у студентов системы знаний, умений и навыков по вопросам современных методов и оборудования для генетического анализа. В результате изучения дисциплины студенты должны знать методы разведения животных, организацию селекционной работы с высокопродуктивными животными, математические методы оценки качественных и количественных признаков у животных. Уметь применять и работать на современном оборудовании для генетических исследований, использовать современные методы для оценки происхождения животных, продуктивности, отбора и подбора в современном животноводстве.

Владеть основными методами генетического анализа и современными математическими методами оценки племенных качеств животных используя современные программы и компьютерные технологии произвести оценку животного: по продуктивности и качеству потомства. Задачей лабораторной практики является закрепление основных разделов теоретического курса, ознакомление студентов с методикой генетического анализа использование ДНК - диагностики для раннего выявления наследственных дефектов у животных, гель-электрофорез ДНК, а также выделение ДНК с помощью различных наборов

Конечная цель обучения, чтобы обучающийся был способен распознавание и обозначение генетических болезней, умел выявлять патологические признаки и доказывать обнаруженные отклонения. По каждой теме предусмотрены: минимум теоретического материала, ход выполнения работы, перечень необходимого оборудования и реактивов, пример расчета, форма записи и список литературы.

## ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ

### ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДНК-ДИАГНОСТИКИ ДЛЯ РАННЕГО ВЫЯВЛЕНИЯ НАСЛЕДСТВЕННЫХ ДЕФЕКТОВ У ЖИВОТНЫХ

Диагностика генетических нарушений - это распознавание и обозначение генетических болезней, складывающаяся из двух частей: выявления патологических признаков и доказательства наследуемости обнаруженных отклонений.

Понятие «оценка генетического здоровья» подразумевает проверку фенотипически нормальной особи на предмет выявления неблагоприятных рецессивных аллелей. Специальная область такой оценки - испытание устойчивости животных к полигенно-детерминированным заболеваниям (наследственно-средовые болезни) как испытание резистентности к инфекции и климатическим воздействиям.

Также применяют методы, позволяющие рассматривать и исключать влияние среды. Диапазон диагностических методов чрезвычайно широк, поскольку приходится рассматривать структуру и функцию организма в целом. Эти методы можно разделить на две группы: рутинные и специальные. К первым относят методы фенотипической оценки животных (бонитировку), клинические методы, методы патологической анатомии, гистологии и патфизиологии. К специальным методам, имеющим более важное значение, относят цитогенетические и иммуногенетические методы культуры клеток, культуры фибробластов кожи или клеток крови. В ветеринарии цитогенетические методы применяют преимущественно для установления нормального хромосомного статуса, при изучении интерсексуальности, мозаицизма, химеризма (фримартини) и стерильности. С помощью данных методов выявлены многочисленные гоносомные и аутосомные аномалии. Иммуногенетические методы применяют для изучения идентичности или происхождения животных, при исследовании некоторых специфических дефектов (иммунопарезы, патопроотеинемии, мозаицизм и химиризм). Спектр иммуногенетических методов охватывает серологические методы (реакции преципитации, агглютинации, реакции связывания комплемента), разные методы электрофореза, иммуно-электрофорез и другие специальные методы.

Учет генетически обусловленных аномалий и анализ предположительно генетически обусловленных аномалий -- задача далеко не из легких.

Генетически обусловленные аномалии подтверждаются после исключения влияния определенных факторов среды на основании передачи аномалий из поколения в поколение и статистически достоверного избытка носителей данного признака среди родственников пробанда по сравнению с общей популяцией.

Генетико-статистический анализ проходят две группы данных: популяционные (частота врожденных аномалий в совокупной популяции, частота врожденных аномалий в субпопуляции -- линии) и семейные (доказательство генетической обусловленности и определение типа наследования, коэффициента инбридинга, инбредной депрессии). При изучении генетической обусловленности и типа наследования сравнивают наблюдаемые численные соотношения нормального и дефектного фенотипов в потомстве группы родителей одинакового (теоретически) генотипа с вычисленными биномиальными вероятностями расщепления согласно законам Г. Менделя.

Так как при анализе родословной размер семьи недостаточно велик, то подобный анализ дает большей частью неполную картину. Этот недостаток устраняется, комбинируванием данных по различным семьям. При исследовании на доминантный характер наследования необходимо учесть всех потомков от скрещиваний, где один из родителей является носителем признака.

Задача генетической профилактики -- предупреждение возникновения наследственных заболеваний у сельскохозяйственных животных. Генетическая профилактика направлена против наследственных заболеваний, обусловленных

олигогенами, так и против тех, что обусловлены генетическими и средовыми факторами. Возможность и эффективность генетической профилактики связаны с особенностями методов разведения. В практике животноводства действуют естественный и искусственный отбор.

Естественный отбор помогает элиминировать нежелательные аллели. Однако этот процесс протекает довольно медленно, следовательно, его необходимо дополнить искусственным отбором. Успеху отбора противодействует поступление нового генетического материала (повторные мутации и миграция), а также определенные механизмы, обеспечивающие защиту существующего в популяции фонда изменчивости. Защиту генетической изменчивости против элиминации отбором обеспечивают цитофизиологические и экологические механизмы. Цитофизиологические механизмы противодействуют отбору, комбинируя влияние на фенотипы одного гена с влиянием других генов.

Таким образом, возникающие при этом различные генотипы имеют разную селективную ценность. Следовательно, фенотипическое проявление генов, которое могли бы оказать повреждающее действие, снижается, а в экстремальном случае подавляется. Сюда относятся такие процессы, как полная рецессивность, неполная пенетрантность (система модификаторов), гетерозис (сбалансированный полиморфизм), сцепление и эпистаз.

Методы генетических исследований это гибридологический, генеалогический, цитогенетический, биохимический, дерматоглифический, близнецовый, популяционно-статистический, методы геной инженерии и метод моделирования.

Гибридологический метод (метод скрещивания) является основным на протяжении многих лет. Разработан Г. Менделем. Заключается в скрещивании (гибридизации) организмов, отличающихся друг от друга одним или несколькими наследственными признаками.

С помощью скрещивания можно установить: 1) доминантен или рецессивен исследуемый признак (и соответствующий ему ген); 2) генотип организма; 3) взаимодействие генов и характер этого взаимодействия; 4) сцепление генов с полом и т. д.

Метод имеет один недостаток – его нельзя использовать в исследовании людей, так как скрещивать *homo sapiens* в эксперименте не представляется возможным.

Генеалогический метод заключается в анализе родословных, и позволяет определить тип наследования признака (доминантный, рецессивный, аутосомный или сцепленный с полом), а также его моногенность или полигенность. На основе полученных сведений прогнозируют вероятность проявления изучаемого признака в потомстве, что имеет большое значение для предупреждения наследственных заболеваний; для изучения мутационного процесса, особенно в случаях, когда необходимо отличить вновь возникшие мутации от тех, которые носят семейный характер, т. е. возникли в предыдущих поколениях. Как правило, генеалогический метод составляет основу для заключений при медико-генетическом консультировании (если речь не идет о хромосомных болезнях).

Так устанавливают наследование индивидуальных особенностей человека: черт лица, роста, группы крови, умственного и психического склада, а также некоторых заболеваний. Например, при изучении родословной королевской династии Габсбургов в нескольких поколениях прослеживаются выпяченная нижняя губа и нос с горбинкой.

Цитогенетический метод заключается в изучении количества, формы и размеров хромосом у животных и растений. Он очень ценен для изучения как нормального кариотипа (морфологических особенностей хромосомного набора), так и для диагностики наследственных заболеваний и мутаций.

Например, когда во время мейоза (деления половых клеток) гомологичные хромосомы не расходятся, то в зиготе оказываются три гомологичные (отвечающие за одни и те же признаки) хромосомы вместо двух. Если данная хромосомная aberrация (трисомия),

отмечается в 21-й паре хромосом, возникает болезнь Дауна: монголоидное лицо, неправильная форма ушей, малый рост, короткие руки, умственное недоразвитие.

Биохимический метод позволяет выявить нарушения внутреннего химизма организма, которые могут указывать на носительство аномального гена. Заболевания, в основе которых лежит нарушение обмена веществ, составляют значительную часть генной наследственной патологии. К ним относятся сахарный диабет, фенилкетонурия, галактоземия (нарушение усвоения молочного сахара) и другие. Этот метод позволяет установить болезнь на ранней стадии и лечить ее. Скрининг на биохимические маркеры генетических болезней является сейчас обязательным для новорождённых.

Дерматоглифический метод. Предметизучения – рисунки на ладонях, подошвах и пальцах. При хромосомных заболеваниях рисунки изменяются, например, обезьянья складка на ладони при болезни Дауна.

Близнецовый метод – позволяет определить влияние среды на однояйцевых близнецов, которые генетически идентичны. Это позволяет с большой достоверностью оценить роль внешних условий в реализации действия генов.

Популяционный метод. Состоит в определении частоты гена в популяции согласно закону Харди-Вайнберга. На основе данного метода оценивают распределение особей разных генотипов, анализируют динамику генетической структуры популяций под действием различных факторов. Например, ген дальтонизма: проявляется больше у мужчин – до 7-8% (у женщин – 0,5%, хотя носителями гена являются 13%).

Метод генной инженерии – с его помощью ученые изменяют генотипы организмов: удаляют и перестраивают определенные гены, вводят другие, соединяют в генотипе одной особи гены различных видов и т.д.

Метод моделирования – изучает болезни человека на животных. В основе этого метода лежит закон Вавилова.

Экологические влияния основаны на многообразии факторов среды, ведущих к нейтрализации противоположно направленного давления отбора.

Использование производителей способствует поступлению нового генетического материала, наряду с этим в популяции действует отбор, который ставит границу для беспрепятственного распространения повреждающих генов, что способствует установлению состояния равновесия. Впоследствии это равновесие стабилизируется процессами, которые оказывают двоякое защитное действие: защищают индивидов от фенотипического выражения аномального гена и одновременно препятствуют полной его элиминации отбором.

Следовательно, в результате подобных процессов в популяции устанавливаются типичные средние частоты аномалий. Например, в популяции красного датского скота частота гипоплазии гонад составляет 0,3 %, у черно-пестрого -- 0,8 %; частота крипторхизма 0,7 и 0,3 % соответственно, сегментной аплазии вольфова протока для обеих пород-- 0,8 %. При инбридинге, дрейфе генов значительно повышаются частоты аномалий. Установлено, что у крупного рогатого скота джерсейской породы в двух различных стадах частота встречаемости удвоения шейки матки составила 36,8 и 26,1 % соответственно.

В некоторых хозяйствах, разводящих лошадей, гибель жеребят из-за атрезии ануса достигала от 12,5 до 55 %. У птицы частота встречаемости аномалий зарегистрирована в более высоких показателях. О генетических заболеваниях, обусловленных олигогенами, известно, что в общей популяции они сравнительно редки.

Генетическая профилактика популяций сводится к следующему: проверке используемых быков-производителей в различных стадах их матерей, а также проведению соответствующих селекционных мероприятий. Прежде всего, эти мероприятия направлены на снижение частоты аномалий развития в популяции путем использования производителей, свободных от нежелательных генов, и на повышение успеха селекции путем выявления носителей гена.

Обследование матерей племенных производителей охватывает наряду с простыми менделирующими дефектами в первую очередь нарушения обмена, полового цикла, инфекционные заболевания, то есть главным образом полигенно детерминированные признаки.

Важнейшими критериями специальных программ по генетическим аномалиям в настоящее время остаются наблюдаемые частоты генов, обуславливающие аномалии в стадах и породах. Прежде всего, безусловной элиминации подлежат те жеребцы-производители, которые оказались гетерозиготными по летальному гену, а также те, среди потомства которых доля особей, несущих аномалию по невыявленным причинам, в 5 раз выше частоты дефекта в общей популяции. Индивидуальная профилактика направлена, прежде всего, против заболеваний, обусловленных генетическими и средовыми факторами, в том случае, если удастся выявить предрасположенных к заболеваниям животных.

Успех селекции зависит от селекционного дифференциала, величины коэффициента наследуемости, интенсивности отбора, числа одновременно селекционируемых признаков, корреляции между селекционируемыми признаками и интервалом между поколениями. Успех отбора при наследственно-средовых заболеваниях зависит главным образом от величины коэффициента наследуемости.

Селекционный процесс, направленный на устранение генетических аномалий в популяции, представляет серьезную проблему, и он в какой-то мере ограничен по следующим причинам: животные не в одинаковой степени испытывают на себе воздействие внешних причин, то есть в данном случае возбудителей болезни, которые в первую очередь устраняются искусственно из-за возможного экономического ущерба или из-за патогенности для человека; происходят изменения со стороны внешней причины -- повышение вирулентности возбудителя или со стороны пробанда -- иммунитет, иммунотолерантность и др. Вместе с тем прилагаются усилия к поиску достаточно простых и доступных физиологических или анатомических признаков, которые могли бы быть своеобразным «маркером» устойчивости или предрасположенности к наследственно-средовым заболеваниям. Учет устойчивости или предрасположенности, как и процент ремонта стада, определяется интенсивностью проводимой селекции. В случае, если в популяции имеются здоровые и больные особи, а доля больных особенно высока, то вести селекцию практически невозможно. Проведение селекции на резистентность животных в отношении наследственно-средовых заболеваний требует значительного времени и более жестких мер. Когда невозможно выявить животных с предрасположенностью к наследственно-средовым заболеваниям, приходится ограничиваться мероприятиями по устранению тех средовых факторов, которые способствуют проявлению соответствующих задатков.

#### Вопросы для самоконтроля

- 1) Определение диагностика генетических нарушений?
- 2) Основная задача генетической профилактики?

#### Список литературы

##### *Основная*

1. Разведение животных: учебник / В. Г. Кахикало, Н. Г. Фенченко, О. В. Назарченко, С. А. Гриценко. – Санкт-Петербург : Лань, 2020. – 336 с. – ISBN 978-5-8114-4085-6. – Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. – URL: <https://e.lanbook.com/book/133905> (дата обращения: 28.12.2020). – Режим доступа: для авториз. пользователей.

##### *Дополнительная*

1. Лебедько, Е. Я. Иммуногенетическая экспертиза достоверности происхождения племенного крупного рогатого скота : учебное пособие / Е. Я. Лебедько. – Санкт-Петербург : Лань, 2020. – 68 с. – ISBN 978-5-8114-4072-6. – Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. – URL: <https://e.lanbook.com/book/140753> (дата обращения: 28.12.2020). – Режим доступа: для авториз. пользователей.

2. Машкин, В. И. Зооресурсоведение: учебное пособие / В. И. Машкин, Е. В. Стасюк. – Санкт-Петербург : Лань, 2019. – 264 с. – ISBN 978-5-8114-3319-3. – Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. – URL: <https://e.lanbook.com/book/112689> (дата обращения: 28.12.2020). – Режим доступа: для авториз. пользователей.

## ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №1.

### ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК С ПОМОЩЬЮ НАБОРА DIAtom™DNAPrep

*Цель работы:* научиться выделять ДНК из образцов тканей сельскохозяйственных животных с помощью коммерческого набора DIAtom™DNAPrep (ООО «НПФ Генлаб»).

#### *Оборудование и материалы*

Работа проводится в зоне выделения нуклеиновых кислот

*Оборудование:* термостат, поддерживающий температуру  $65 \pm 2^\circ\text{C}$ ; микроцентрифуга, развивающая ускорение до 10000 g; вортекс, ротатор, дозаторы на 1000, 200, 10 мкл; цилиндр мерный на 200-500 мл; штатив для пробирок.

*Расходные материалы:* одноразовые наконечники (на 1000, 200, 10 мкл), пластиковые пробирки 1,5 мл, перчатки резиновые или латексные, неопудренные.

*Реактивы:* Lysis reagent (Лизирующий раствор), 1 флакон, 60 мл; Saline buffer (Солевой), 10-кратный буфер, 1 флакон, 5 мл; NucleoS™ (Суспензия сорбента), 2 пробирки по 1 мл; ExtraGen (Экстра Ген, суспензия смеси ионообменников), 1 флакон, 10 мл; спирт этиловый 96%, вода дистиллированная.

*Биологический материал:* выщип ткани (свиней, КРС, овец).

#### *Ход работы*

Для снижения риска кросс-контаминации все манипуляции производить только в перчатках! Наконечники для автоматического дозатора необходимо использовать однократно. Выделение ДНК Набор реагентов DIAtom™DNAPrep100 основан на использовании лизирующего реагента с гуанидинтиоционатом, который предназначен для лизиса клеток, солюбилизации клеточного дебриса, а также для денатурации клеточных нуклеаз. В присутствии Лизирующего реагента ДНК активно сорбируется на NucleoScорбенте, затем легко отмывается от белков и солей спиртовым раствором. ДНК, элюированная из сорбента ЭкстраГеном™ или чистой водой, может быть напрямую использована по назначению.

#### *Этапы работы*

Приготовление рабочего раствора Солевого буфера. Содержимое флакона с 10-кратным Солевым буфером, 5 мл, перенести в мерный цилиндр, довести бидистиллированной водой до метки 50 мл и 96% этиловым спиртом до метки 150 мл и перемешать. Готовый рабочий раствор Солевого буфера следует хранить в герметично закрытой посуде при температуре  $4^\circ\text{C}$ .

1. Подготовить пробирки в соответствии с количеством исследуемых образцов. Пробирки промаркировать в соответствии с номерами образцов. В каждую пробирку внести соответствующий образец площадью  $1 \text{ мм}^2$ , добавить 400 мкл Лизирующего реагента, и перемешать содержимое пробирки переворачиванием (5-10 раз). Интенсивное встряхивание смеси не рекомендуется.

2. Термостатировать пробирки 2 часа при температуре 65°C.
3. Подготовить чистые пробирки, промаркировать в соответствии с образцами. В каждую пробирку внести 20 мкл суспензии сорбента NucleoS™ (перед использованием NucleoS™ следует интенсивно встряхнуть на вортексе).
4. После термостатирования пробирки со смесью центрифугировать 10 сек при 5000g и перенести прозрачный супернатант в пробирки с суспензией сорбента NucleoS™.
5. Пробирки поместить на ротатор и перемешивать 10 мин (10-20 об/мин).
6. Центрифугировать 10 сек при 5000 g.
7. Осторожно слить супернатант, следя за тем, чтобы осадок остался в пробирке.
8. К осадку добавить 200 мкл Лизирующего реагента, тщательно перемешать на вортексе до полного гомогенного состояния.
9. Добавить в пробирку 0,5 мл рабочего раствора Солевого буфера.
10. Перемешать содержимое пробирки переворачиванием пробирки 5-10р.
11. Центрифугировать 10 сек при 5000 g.
12. Осторожно слить супернатант, следя за тем, чтобы осадок остался в пробирке.
13. Добавить в пробирку 0,5 мл Солевого буфера, перемешать содержимое пробирки на вортексе, центрифугировать 10 сек при 5000 g и осторожно слить супернатант.
14. Повторить положение 13.
15. Подсушить осадок при температуре 65°C в течение 4-5 мин.
16. Внести 60 мкл ЭкстраГена™.
17. Перемешать содержимое пробирок на вортексе 5-10 сек до получения гомогенной суспензии, потом термостатировать 4-5 мин при 65°C.
18. Еще раз перемешать содержимое пробирок на вортексе перед центрифугированием.
19. Центрифугировать 1 мин при 10000 g.
20. Перенести супернатант с ДНК в чистые, промаркированные пробирки. Пробирки с раствором ДНК поставить в холодильник, при необходимости длительного хранения поместить в морозильную камеру.

#### Вопросы для самоконтроля

- 1) Методика выделения ДНК?
- 2) Какие виды наборов существуют для выделения ДНК у животных?

#### Список литературы

##### *Основная*

1. Разведение животных: учебник / В. Г. Кахикало, Н. Г. Фенченко, О. В. Назарченко, С. А. Гриценко. – Санкт-Петербург : Лань, 2020. – 336 с. – ISBN 978-5-8114-4085-6. – Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. – URL: <https://e.lanbook.com/book/133905> (дата обращения: 28.12.2020). – Режим доступа: для авториз. пользователей.

##### *Дополнительная*

1. Лебедько, Е. Я. Иммуногенетическая экспертиза достоверности происхождения племенного крупного рогатого скота : учебное пособие / Е. Я. Лебедько. – Санкт-Петербург : Лань, 2020. – 68 с. – ISBN 978-5-8114-4072-6. – Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. – URL: <https://e.lanbook.com/book/140753> (дата обращения: 28.12.2020). – Режим доступа: для авториз. пользователей.

## ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №2.

### ГЕЛЬ-ЭЛЕКТРОФОРЕЗ ДНК

*Цель работы:* ознакомиться с методикой проведения электрофореза в агарозном геле.

Оборудование и материалы

*Оборудование:*

1. Ламинар типа «ПЦР-бокс»
2. Трансиллюминатор (Рисунок 2)
3. Камера для электрофореза
4. Видео-система Gellmager для документации результатов электрофореза, программное обеспечение

5. Источник питания (программируемый) «ЭЛЬФ-4»

6. Дозаторы HTL «VE-series»

7. Штатив для дозаторов

8. Штатив рабочее место 200X0,5мл.

*Расходные материалы:* одноразовые наконечники (на 1000, 200, 10 мкл), пластиковые тонкостенные пробирки, перчатки резиновые или латексные, неопудренные.

*Реактивы:*

1. 10 x буфер трис-борат-ЭДТА (ТБЭ): 0,9 М основной трис, 0,9 М борная кислота, 20 мМ ЭДТА. рН доводят до 8,1—8,2 сухой борной кислотой

2. Агароза (для электрофореза)

3. Бромистый этидий EtBr: 10 мг/мл в стерильной дистиллированной воде

4. 6x буфер для нанесения: 0,25% бромфеноловый синий, 40% (в/о) сахара в 1x ТБЭ.

*Биологический материал:* фрагмент ПЦР-ПДРФ

Реактивы комплекта содержат токсичный компонент бромистый этидий. Все работы с комплектом реагентов необходимо проводить в резиновых перчатках и халате!

*Ход работы:*

1. Приготовить 1 x ТБЭ в объеме, достаточном для заполнения камеры для электрофореза и приготовления геля.

2. Добавить к 1 x ТБЭ агарозу в количестве, необходимом для получения 0,35—0,45% (в/о) раствора, и нагреть в микроволновой печи до полного расплавления агарозы.

3. Охладить смесь до +/- 50 °С.

4. Добавить к раствору остывшей агарозы 5 мкл бромистого этидия и осторожно перемешать, избегая появления в геле пузырьков воздуха.

5. Теплую агарозу вылить в кювету для геля и равномерно распределить по кювете. Вертикально вставить гребенку так, чтобы ее зубцы не доставали до дна примерно 1,5 мм.

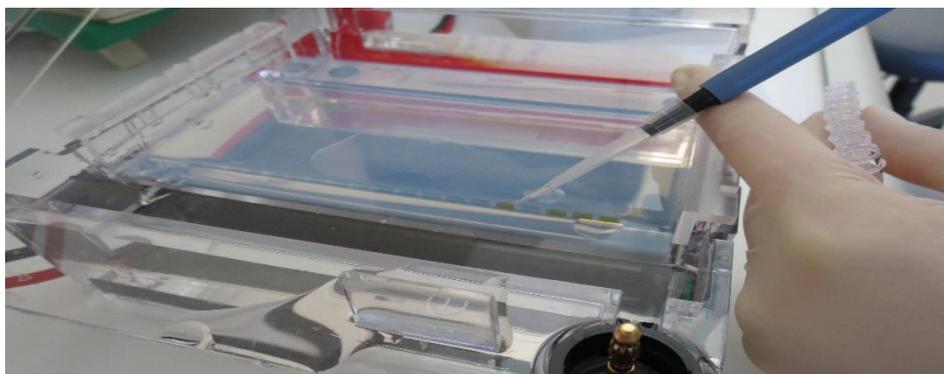


Рисунок 1. Кювета с агарозным гелем и гребенкой

6. Оставить кювету с агарозным гелем на 10-20 мин, затем осторожно удалить гребенку. Поместить пластину с агарозным гелем в камеру для электрофореза. Буфер для электрофореза должен покрывать пластину с гелем слоем приблизительно в 5 мм. При работе с агарозным гелем следует обязательно надевать резиновые перчатки!

7. Внесите по 7 мкл продукта амплификации в соответствующие лунки агарозного геля под буфера. Для повышения точности определения размера фрагмента маркерную ДНК наносят с краю или по обе стороны от исследуемой ДНК. Примечание: при нанесении продукта амплификации допускается использование одного наконечника, в этом случае необходимо промывать наконечник водой после нанесения каждого образца (путем многократного пипетирования воды). При анализе продуктов ПЦР из пробирок, запечатанных парафином, рекомендуется использовать пипетки для наконечников с поршнем.

8. Установить крышку на камеру для электрофореза и подключить источник постоянного тока. Электрофорез проводить при напряжении 20 В/см геля в течение 40-90 мин. (при ширине камеры 10 см напряжение, устанавливаемое в источнике постоянного тока, должно быть приблизительно равно 200 В).

9. После окончания электрофореза отключить источник постоянного тока, снять крышку с камеры. В резиновых перчатках вынуть пластину с агарозным гелем из камеры для электрофореза, снять гель с пластины и поместить на экран трансиллюминатора. Включить трансиллюминатор.

10. Учет результатов ПЦР-амплификации ДНК проводить согласно инструкции к комплекту реагентов для ПЦР-амплификации ДНК (рисунок).

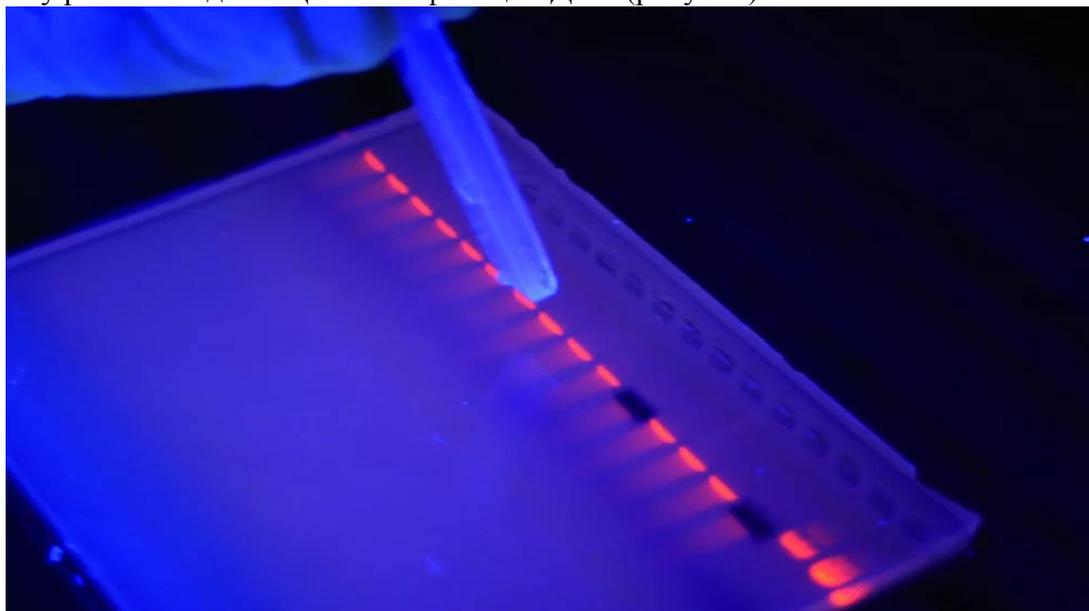


Рисунок 2. Детекция гель-электрофорез.

Гелевые карманы расположены внизу. 1,2,3 один и тот же образец, но разное качество выделенной ДНК. 1- большое количество ДНК. 3-мало выделенной ДНК.

#### Вопросы для самоконтроля

- 1) Электрофорез определение?
- 2) Положительные и отрицательные характеристики гель-электрофореза?

#### Список литературы

*Основная*

1. Разведение животных: учебник / В. Г. Кахикало, Н. Г. Фенченко, О. В. Назарченко, С. А. Гриценко. – Санкт-Петербург : Лань, 2020. – 336 с. – ISBN 978-5-8114-4085-6. – Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. – URL: <https://e.lanbook.com/book/133905> (дата обращения: 28.12.2020). – Режим доступа: для авториз. пользователей.

*Дополнительная*

1. Лебедько, Е. Я. Иммуногенетическая экспертиза достоверности происхождения племенного крупного рогатого скота : учебное пособие / Е. Я. Лебедько. – Санкт-Петербург : Лань, 2020. – 68 с. – ISBN 978-5-8114-4072-6. – Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. – URL: <https://e.lanbook.com/book/140753> (дата обращения: 28.12.2020). – Режим доступа: для авториз. пользователей.