

Дальневосточный государственный технический  
рыбохозяйственный университет

**МЕТОДЫ ФИКСАЦИИ ОБРАЗЦОВ И ВЫДЕЛЕНИЯ ГЕ-  
НОМНОЙ ДНК ИЗ ТКАНЕЙ ГИДРОБИОНТОВ**

Методические указания по выполнению практических работ  
для студентов всех форм обучения направления подготовки  
«Водные биоресурсы и аквакультура»

Владивосток  
2017



УДК 574.55 + 574.52(075.8)

ББК 28.082я73

Т 861

Автор – С.В. Туранов

Рецензенты: Д.б.н., профессор Ю.Ф. Картавцев, ННЦМБ ДВО РАН

Печатается в авторской редакции

Дальневосточный государственный технический  
рыбохозяйственный университет, 2017 г.

Методические указания составлены<sup>1</sup> согласно учебному плану для студентов всех форм обучения направления подготовки «Водные биоресурсы и аквакультура» в рамках дисциплины (модуля) «Методы молекулярной генетики в аквакультуре, при исследовании биоразнообразия и филогении».

Умение специалиста-биолога правильно собрать и зафиксировать ткани гидробионтов с наименьшими рисками для деградации геномной ДНК является обязательным навыком, определяющим возможность адекватного применения молекулярно-генетических методов в аквакультуре и смежных направлениях, связанных с оценкой различных характеристик биологического разнообразия водных организмов, а также мероприятий по сохранению генетической стабильности природных и искусственно поддерживаемых популяций.

Настоящие методические указания помогут студентам-биологам, а также специалистам рыбного хозяйства освоить базовые навыки фиксации тканей и подготовки препаратов дезоксирибонуклеиновой кислоты для последующего проведения молекулярно-генетического анализа.

---

<sup>1</sup> При частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 16-34-00298)

## Содержание

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №1.....	5
ЗАДАЧА: Сбор и фиксация тканей гидробионтов и культур микроводорослей.....	5
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №2.....	7
ЗАДАЧА 1: Лизис тканей гидробионтов.....	10
ЗАДАЧА 2: Хлороформ-фенольный метод выделения ДНК.....	11
ЗАДАЧА 3: Метод выделения ДНК на <i>silica spin</i> колонках.....	12
ЗАДАЧА 4: Метод выделения ДНК посредством высокотемпературного щелочного лизиса (HotSHOT).....	13
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №3.....	15
ЗАДАЧА: Определение концентрации и качества геномной ДНК гидробионтов посредством электрофореза в агарозном геле.....	16
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	18

## **ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №1**

### **Сбор и фиксация различных типов тканей и культур гидробионтов для проведения молекулярно-генетических исследований**

Стандартный набор оборудования и материалов современного исследователя молекулярно-генетического направления позволяет в короткие сроки получить высокомолекулярную геномную ДНК из огромного количества биологических образцов. Однако зачастую специалисты рыбного хозяйства во время взятия образцов гидробионтов сталкиваются с проблемой удаленности от места непосредственного проведения молекулярно-генетического анализа либо по иным причинам не имеют возможности приступить к выделению геномной ДНК сразу после взятия образцов от гидробионтов. Чтобы избежать потери материала, а также снизить возможность деградации высокомолекулярной геномной ДНК, необходимо обладать навыками фиксации тканей, которые могут обеспечить длительное хранение. Одним из наиболее часто используемых в данных целях фиксирующим агентом является этиловый спирт (этанол) благодаря своей низкой стоимости и высокой эффективности сохранения тканей в сравнении с другими агентами [11, 13]. Принцип фиксации ткани в этаноле заключается в её дегидратации, т.е. практически полном избавлении ткани от воды, за счет чего обеспечивается сохранность геномной ДНК. При сочетании данных условий с охлаждением образцов можно достигнуть эффективной фиксации без потери целостности ДНК в течение сотен лет.

В целях обеспечения стандартизации протокола взятия проб необходимо также знать, в какой именно части гидробионта сосредоточены ткани с наибольшим потенциальным выходом геномной ДНК. Так, например, у рыб наиболее приемлемой для получения высокомолекулярной ДНК является сердечная мышца, за ней в порядке значимости следуют ткани скелетных мышц и парные плавники.

**ЗАДАЧА: Сбор и фиксация тканей гидробионтов и культур микроводорослей.**

**Цель работы:** получить навыки сбора и фиксации биологического материала.

**Оборудование и материалы:**

1. Вортекс (не обязательно).
2. Дозатор автоматический объёмом до 1000 мкл.
3. Скальпель.
4. Пинцет глазной.
5. Штатив для пробирок.
6. Микроцентрифужные пробирки типа Эппендорф 1,5 мл.
7. Перчатки.
8. Наконечники пластиковые для автоматического дозатора объёмом до 1000 мкл.
9. Перманентный маркер или карандаш.
10. 95% этиловый спирт.
11. Спиртовая горелка.

**Ход работы:**

1. Подготавливают пробирку, перманентным маркером наносят на крышку пробирки индивидуальный номер образца, дублируют надпись на стенке пробирки.

2. Вносят в каждую пробирку по 1 мл 95% этанола.

3. Отрезают скальпелем кусочек ткани (сердце/скелетная мышца/парный плавник/мускул-замыкатель) либо отбирают дозатором сконцентрированную культуру микроводорослей объёмом до 1мл с таким расчетом, чтобы объём фиксатора был как минимум в 2 раза больше фиксируемой ткани или культуры микроводорослей.

4. Вносят ткань (пинцетом) или культуру (дозатором) в подготовленную пробирку. Закрывают пробирку и интенсивно встряхивают на вортексе или вручную, не допуская при этом прилипания ткани к стенкам пробирки.

5. Непосредственно перед взятием следующего образца стерилизуют скальпель и пинцет над пламенем спиртовой горелки, а также меняют наконечник автоматического дозатора.

6. Через сутки после первичной фиксации спирт в пробирках с тканью заменяют на новый.

7. Пробирки с образцами хранят при температуре не выше -20°C.

**Контрольные вопросы к лабораторной работе:**

1. Для чего необходимо освоение методов фиксации тканей гидробионтов?

2. Какие фиксирующие агенты вам известны? В чем, по-вашему, преимущество этилового спирта перед другими фиксаторами?

3. В чем состоит принцип фиксации тканей гидробионтов с использованием этилового спирта?

4. Каким должно быть соотношение объемов фиксирующего агента и ткани?

5. С какой целью производится стерилизация инструментов перед взятием образцов?

## **ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №2**

### **Методы выделения ДНК из свежих и этанол-фиксированных тканей гидробионтов**

Процедура получения геномной ДНК из тканей гидробионтов, несмотря на широкое разнообразие доступных экспресс-методов выделения, также требует групп-специфичной оптимизации и знания химических особенностей всего процесса. Наиболее наглядным примером являет существование естественных различий в строении клеток растений и животных, что требует использования принципиально разных детергентов для разрушения клеточной стенки в процессе лизиса. В области применения молекулярно-генетических методов к практическим и фундаментальным задачам рыбного хозяйства в качестве наиболее часто используемых методов получения геномной ДНК из образцов ткани можно выделить хлороформ-фенольный метод (далее - *МХФ*), а также метод выделения на *silica spin* колонках (далее - *SSP*). При этом первый с развитием высокопроизводительных модификаций и роботизированных систем постепенно уступает второму [6, 8, 16]. Эти методы объединяет использование предварительного лизиса ткани в присутствии протеиназы *K*, однако, процесс получения очищенной геномной ДНК у них отличается коренным образом. Гораздо реже используется в нашем направлении метод высокотемпературного щелочного лизиса, иначе называемый *HotSHOT* [15]. Анализ литературы показывает, что данный метод успешно задействован при выделении ДНК как из свежих или замороженных (но не зафиксированных) тканей рыб [10, 14], так и после предварительной фиксации тканей в фик-



сирующих растворах – этиловом спирте или диметилсульфоксиде [3, 4, 5, 7]. Однако возможность использования свежей ткани гидробионтов, как уже отмечалось ранее, зачастую ограничена естественной удаленностью молекулярно-генетической лаборатории от мест сбора первичного материала. Известно, что фиксирование ткани в 95% этаноле может вести к формированию прочных связей ДНК-белок, которые нивелируются посредством депротеинизации при использовании *МХФ* и *SSP* [12].

Предварительным этапом этих методов является лизис ткани в присутствии фермента протеиназы *K*. Перед началом процедуры лизиса важно избавиться от остатков фиксатора ткани, который может ингибировать процесс. На данном этапе выделения геномной ДНК происходит разрушение клеточной структуры ткани в присутствии сильных детергентов, служащих для разрушения билипидного слоя клеточных мембран. Присутствие соли обеспечивает разницу осмотического давления, и при разрушении клетки её содержимое переносится в раствор. Протеиназа разрушает пептидные связи, что необходимо для освобождения ДНК от гистонных белков. Последующая процедура очищения тотальной ДНК различна для методов *МХФ* и *SSP*.

*МХФ*. К раствору лизированной ткани добавляют хлороформ с последующим продолжительным встряхиванием и центрифугированием. В процессе центрифугирования раствор разделяется на 3 фазы: верхнюю (водную с растворённой ДНК), среднюю (интерфаза, сгусток структурных элементов клетки) и нижнюю (хлороформ). Далее отбирают верхнюю фракцию, переносят её в чистую пробирку и повторяют действия с раствором лизированной ткани два-три раза. В ходе этой процедуры отрицательно заряженная ДНК, являясь в щелочной среде полярной (*pH* лизирующего буфера примерно равен 8.0), наиболее эффективно растворяется в верхней водной фазе (вода является более полярной, чем хлороформ), в то время как гидрофобные компоненты белков из раствора лизированной ткани преципитируют в присутствии хлороформа [9]. Остатки липидов, будучи растворимыми в хлороформе, остаются в нижней фазе.

Полярная ДНК в водном растворе с высоким *pH* подвержена гидратации, то есть все её отрицательно заряженные фосфатные группы обволакивают полярные молекулы воды. Для того, чтобы ДНК выпала в осадок, необходимо, во-первых, добавить в раствор

достаточное количество положительных ионов (наиболее часто в качестве соли используется ацетат аммония) для связывания с фосфатными группами, а во-вторых, уменьшив полярность воды, избавиться от гидратации [2, 17, 18]. Это достигается добавлением в раствор 2-3 объёмов изопропилового спирта. Для формирования осадка ДНК полученный раствор подвергают длительному (около 20 мин.) центрифугированию с последующим подсушиванием и растворением осадка в буфере для хранения.

*SSP*. В отличие от *МХФ* в данном случае к раствору лизированной ткани добавляют раствор гуанидин тиоцианата ( $\text{GuSCN}$ ), который выступает в качестве хаотропного агента комплексного действия, нивелируя гидрофобные свойства белков (в том числе возможных нуклеаз), а также уменьшая полярность воды вместе с добавлением этанола. Так формируется раствор связывающего буфера [1]. При этом ДНК получает возможность связывания с диоксидом кремния на фильтрах *silica spin* колонок при пропускании через них полученного раствора, и после промывания спиртом и высушивания смывается с помощью воды или, как в нашем случае, слабого основания ( $\text{TrisHCl}$ ).

В противоположность двум вышеизложенным методикам при высокотемпературном щелочном лизисе (далее - *HSH*) не происходит очищения от белков, и, в купе с тем фактом, что ДНК при использовании данного метода склонна к фрагментации, это может существенно повлиять на возможность получения не только высокомолекулярной геномной ДНК, но и коротких фрагментов молекулярно-генетических маркеров, наиболее часто используемых в прикладных задачах рыбного хозяйства. При высокотемпературном щелочном лизисе на стадии нагревания происходит разрушение структурных элементов клеток, но, в отличие от двух других методов получения ДНК, в данном случае происходит разрушение водородных связей. Из стабильной двухцепочечной формы ДНК переходит в нестабильную одноцепочечную, которая способна формировать стойкие связи с молекулами белков. Денатурация в этом случае в основном обратима, и при понижении температуры происходит гибридизация разошедшихся цепочек, восстановление одноцепочечных фрагментов. При этом успех восстановления двухцепочечной молекулы ДНК обратно пропорционален её длине, что в отличие от первых двух методов препятствует выходу высокомолекулярной геномной ДНК [15]. Несмотря на возможные недостатки

метода, короткое время его исполнения (около 40 мин.), низкая стоимость и возможность одновременной работы с огромным количеством образцов теоретически делает этот метод оптимальным для ограниченного набора применяемых методов. Освоение, адекватное применение и заблаговременная апробация методов выделения ДНК применительно к каждой таксономической группе гидробионтов индивидуально должны позволить избежать чрезмерных издержек и помочь составить рекомендации для лабораторий в условиях минимального финансирования.

### **ЗАДАЧА 1: Лизис тканей гидробионтов.**

**Цель работы:** освоить предварительный этап выделения ДНК – лизис тканей гидробионтов в присутствии протеиназы *K*.

#### **Оборудование и материалы:**

1. Вортекс.
2. Набор автоматических дозаторов объёмом от 10 до 1000 мкл.
3. Скальпель.
4. Пинцет глазной.
5. Спиртовая горелка.
6. Термостат.
7. Штатив для пробирок.
8. Микроцентрифужные пробирки типа Эппендорф 1,5 мл.
9. Перчатки.
10. Перманентный маркер или карандаш.
11. Наконечники пластиковые разного объёма для автоматических дозаторов.
12. Фильтровальная бумага.
13. Лизирующий буфер [100мМ трис-HCl (*pH* 7.4-7.5), 100мМ NaCl, 50 мМ ЭДТА (*pH* 8.0)].
14. Протеиназа *K*.
15. Додецилсульфат натрия (SDS, 10% раствор)

#### **Ход работы:**

1. Подготавливают пробирку, перманентным маркером наносят на крышку пробирки индивидуальный номер образца, дублируют надпись на стенке пробирки.

2. От фиксированной в этаноле ткани отрезают небольшой кусочек (объём, примерно равный спичечной головке). Ткань подсушивают на фильтровальной бумаге, стараясь максимально избавиться от остатков спирта. Если ткань свежая, то процедура подсушивания опускается. Ткань переносится в приготовленную пробирку.

3. В пробирку с тканью последовательно вносят лизирующий буфер и протеиназу *K* в объёме, соответствующем выбранному протоколу выделения. Содержимое встряхивают на вортексе.

4. Содержимое пробирок инкубируют при температуре от 36 до 65°C до максимально полного растворения лизируемой ткани. При необходимости ткань гомогенизируют с помощью пестиков, а также производят периодическое встряхивание пробирок на вортексе.

4. Непосредственно перед отрезанием кусочка ткани от следующего образца стерилизуют скальпель и пинцет над пламенем спиртовой горелки, а также меняют наконечник автоматического дозатора.

## **ЗАДАЧА 2: Хлороформ-фенольный метод выделения ДНК.**

**Цель работы:** освоить метод депротеинизации раствора лизированной ткани с использованием хлороформа, а также осаждения и растворения ДНК.

### **Оборудование и материалы:**

1. Микроцентрифуга с ротором для пробирок типа Эппендорф 1,5 мл.

2. Вортекс.

3. Набор автоматических дозаторов объёмом от 10 до 1000 мкл.

4. Перманентный маркер или карандаш.

5. Перчатки.

6. Микроцентрифужные пробирки типа Эппендорф 1,5 мл.

7. Наконечники пластиковые разного объёма для автоматических дозаторов.

8. Хлороформ.
9. Ацетат аммония.
10. Изопропиловый спирт.
11. Буфер для хранения ДНК [10 мМ ЭДТА ( $pH$  8.0), 1 мМ трис- $HCl$  ( $pH$  7.4-7.5)].

#### **Ход работы:**

1. К раствору лизированной ткани добавляют равный объем хлороформа.
2. Перемешивают пробирки переворачиванием в течение 10 мин.
3. Центрифугируют при 8000 об./мин. в течение 10 мин.
4. Верхнюю водную фазу переносят дозатором в новую пробирку, избегая задевания интерфазы.
5. Процедуру повторяют от 1 до 3 раз.
6. К полученному водному раствору добавляют 1/10 часть ацетата аммония и перемешивают.
7. Добавляют не менее 2 объемов изопропилового спирта и перемешивают переворачиванием.
8. Оставляют пробирки на ночь при 4°C либо на 2 часа при -20°C.
9. Центрифугируют пробирки при 13000 об./мин. в течение 20 мин.
10. Сливают надосадочную жидкость и подсушивают осадок до полного испарения спирта.
11. Растворяют осадок в буфере для хранения ДНК. Выделенную ДНК хранят при -20°C.

#### **ЗАДАЧА 3: Метод выделения ДНК на *silica spin* колонках.**

**Цель работы:** освоить экспресс-метод выделения ДНК с использованием *silica spin* колонок.

#### **Оборудование и материалы:**

1. Микроцентрифуга с ротором для пробирок типа Эппендорф 1,5 мл.
2. Вортекс.
3. Набор автоматических дозаторов объемом от 10 до 1000 мкл.

4. *silica spin* колонки.
5. Наконечники пластиковые разного объёма для автоматических дозаторов.
6. Перчатки.
7. Перманентный маркер или карандаш.
8. Микроцентрифужные пробирки типа Эппендорф 1,5 мл.
9. Связывающий буфер (на основе гуанидин тиоцианата).
10. Промывочные буферы.
11. Буфер для хранения ДНК/элюирующий буфер [10 mM ЭДТА (*pH* 8.0), 1 mM трис-HCl (*pH* 7.4-7.5)] или деионизированная вода.

#### **Ход работы:**

1. К раствору лизированной ткани добавляют объём связывающего буфера, предусмотренный выбранным протоколом выделения.
2. Перемешивают содержимое пробирок интенсивным встряхиванием на вортексе.
3. Переносят содержимое пробирок на колонки.
4. Центрифугируют в соответствии с условиями протокола.
5. Удаляют жидкость из пробирки-приёмника.
6. Выполняют серию промывок промывочными буферами в соответствии с условиями, указанным в протоколе выделения.
7. Переносят колонки в новые пробирки типа Эппендорф 1,5 мл.
8. Вносят на мембрану колонок необходимый объём элюирующего буфера или деионизированной воды.
9. Центрифугируют в соответствии с условиями протокола. При этом ДНК смывается с мембран в новые пробирки, после чего колонки выбрасывают. Выделенную ДНК хранят при -20°C.

#### **ЗАДАЧА 4: Метод выделения ДНК посредством высоко-температурного щелочного лизиса (HotSHOT).**

**Цель работы:** научиться выделять ДНК с помощью высоко-температурного щелочного лизиса.

### **Оборудование и материалы:**

1. Микроцентрифуга с ротором для пробирок типа Эппендорф 0,5 мл.
2. Термостат с возможностью нагрева до 95°C.
3. Вортекс.
4. Автоматический дозатор объёмом до 100 мкл.
5. Наконечники пластиковые объёмом до 100 мкл для автоматических дозаторов.
6. Микроцентрифужные пробирки типа Эппендорф 0,5 мл.
7. Перчатки.
8. Перманентный маркер или карандаш.
9. Буфер для щелочного лизиса (25 mM NaOH, 0.2 mM Na<sub>2</sub>EDTA).
10. Нейтрализующий буфер (40 mM Tris-HCl).

### **Ход работы:**

1. Подготавливают пробирку, перманентным маркером наносят на крышку пробирки индивидуальный номер образца, дублируют надпись на стенке пробирки. Вносят в каждую пробирку по 35-50 мкл буфера для щелочного лизиса.
2. От фиксированной в этаноле ткани отрезают небольшой кусочек (объём не более 1мм<sup>3</sup>). Ткань подсушивают на фильтровальной бумаге, стараясь максимально избавиться от остатков спирта. Если ткань свежая, то процедура подсушивания опускается. Ткань переносится в приготовленную пробирку с буфером.
3. Пробирки помещают в термостат на 30 минут при температуре 95°C.
4. Пробирки остужают до 4°C, после чего прибавляют равный объём нейтрализующего буфера. Содержимое перемешивают на вортексе и сбрасывают на центрифуге для концентрирования нерастворенных частиц ткани на дне.
5. Выделенную ДНК хранят при -20°C.

### **Контрольные вопросы к лабораторной работе:**

1. Для чего необходимо освоение различных методов выделения ДНК из тканей гидробионтов?
2. Перечислите основные методы выделения ДНК, укажите на преимущества и недостатки каждого из них?

3. В чём проявляются принципиальные сходства и отличия основных методов выделения ДНК?

4. Каковы химические особенности процесса лизиса ткани в присутствии протеиназы K?

5. В чем заключаются химические особенности депротеинизации с применением хлороформа?

6. Каковы химические принципы осаждения ДНК из водного раствора?

7. В чём состоит особенность метода выделения на *silica spin* колонках?

8. Каковы преимущества и недостатки высокотемпературного щелочного лизиса?

9. Какой метод бы вы выбрали для получения высокомолекулярной ДНК? Для получения последовательности молекулярно-генетического маркера небольшой длины?

### **ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №3**

#### **Определение концентрации и качества препаратов ДНК из тканей гидробионтов**

Для проверки количества выхода высокомолекулярной ДНК после процедуры выделения, а также оценки её качества существует целый ряд методов, основанных на детекции оснований нуклеиновых кислот. К ним относят методы, использующие фракционирование нуклеиновых кислот при электрофорезе в агарозном геле, свойство адсорбции ультрафиолетового света нуклеиновыми кислотами, а также флуоресценцию оснований нуклеиновых кислот в присутствии специфичных красителей.

Наиболее простым и доступным методом является определение концентрации и качества препаратов нуклеиновых кислот посредством электрофореза в агарозном геле с последующей визуализацией оснований под ультрафиолетовым светом посредством интеркалирующего агента – бромистого этидия [19]. Фрагменты нуклеиновых кислот благодаря фосфатным группам имеют отрицательный заряд и мигрируют в электрическом поле в направлении к положительно заряженному электроду. Скорость миграции фрагментов нуклеиновых кислот при прохождении через поры агароз-



ного геля обратно пропорциональна размеру молекул. По завершении электрофореза гель с фракционированной ДНК экспонируют в растворе бромистого этидия, который интеркалирует основания и способствует 20-кратному увеличению интенсивности свечения ДНК при прохождении через неё ультрафиолетового света (Рис. 1). О концентрации ДНК судят по интенсивности свечения оснований.

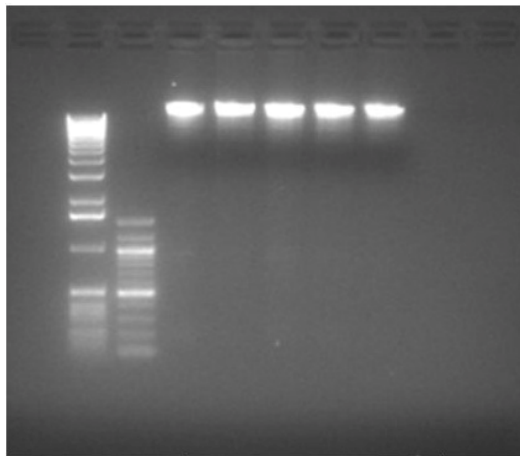


Рисунок 1. Фракционирование маркеров длин ДНК (2 и 3 дорожки), а также высокомолекулярной ДНК злаков (дорожки 4-8) посредством электрофореза в 1% агарозном геле.

**ЗАДАЧА: Определение концентрации и качества геномной ДНК гидробионтов посредством электрофореза в агарозном геле.**

**Цель работы:** освоить принципы метода и получить навыки проведения гель-электрофореза нуклеиновых кислот.

**Оборудование и материалы:**

1. Камера для электрофореза.
2. Корытца и гребенки для формирования геля.
3. Колба для плавления агарозы.
4. Микроволновая печь.

5. Весы.
6. Источник питания для проведения электрофореза.
8. Перчатки.
7. Автоматический дозатор объёмом до 10 мкл.
9. Наконечники пластиковые объёмом до 10 мкл.
10. Пленка parafilm.
11. Агароза.
12. Препараты геномной ДНК гидробионтов.
13. Маркер длин ДНК.
14. ТАЕ буфер для электрофореза (Tris-acetate 40mM, EDTA 1mM).
15. Буфер для нанесения проб (0.2 - 0.25%-ный бромфеноловый синий, 0.25%-ный ксилолцианол, 30%-ный глицерин).

### **Ход работы:**

1. Навешивают необходимое количество агарозы и пересыпают её в колбу.
2. К агарозе прибавляют необходимый объём ТАЕ буфера так, чтобы конечная концентрация агарозы была равна 1%.
2. В течении нескольких минут плавают агарозу в микроволновой печи до полного её растворения.
3. Заливают агарозу в корытце с гребёнкой, задающей количество лунок и оставляют при комнатной температуре до формирования прочного геля.
4. На плёнку parafilm с помощью дозаторов каплями наносят буфер для нанесения по 3 мкл для каждого препарата ДНК.
5. Смешивают по 2 мкл препарата ДНК с каплями буфера для нанесения.
6. Устанавливают гель в камеру для электрофореза. При этом гель должен быть полностью погружен в буфер.
7. Дозатором переносят весь объём каждого препарата (5мкл) в индивидуальную лунку.
8. В свободную лунку также вносят до 5 мкл маркера длин ДНК.
9. На источнике питания устанавливают необходимую величину напряжения (обычно 80-120 В) и время проведения электрофореза (около 20 мин).
10. По завершении электрофореза гель погружают в водный раствор бромистого этидия (около 20 мин), а затем просматривают

результаты под источником ультрафиолетового света либо при помощи гель-документирующей системы.

### **Контрольные вопросы к лабораторной работе:**

1. Перечислите основные способы определения концентрации нуклеиновых кислот, подчеркните преимущества и недостатки каждого из них.

2. Каковы принципы гель-электрофореза нуклеиновых кислот?

3. Что определяет скорость фракционирования при электрофорезе и интенсивность свечения нуклеиновых кислот при их визуализации.

### **СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Boom, R.C.J.A Rapid and simple method for purification of nucleic acids / R.C.J.A. Boom, C.J. Sol, M.M. Salimans, C.L. Jansen, P.M. Wertheim-van Dillen, J.P.M.E. Van der Noordaa // Journal of clinical microbiology. – 1990. – Т. 28. – №. 3. – С. 495-503.
2. Crouse, J. Ethanol precipitation: ammonium acetate as an alternative to sodium acetate / J. Crouse, D. Amorese // Focus. – 1987. – Т. 9. – №. 2. – С. 3-5.
3. DiBattista, J.D. Phylogeography of two closely related Indo-Pacific butterfly fishes reveals divergent evolutionary histories and discordant results from mtDNA and microsatellites / J.D. DiBattista, L.A. Rocha, M.T. Craig, K.A. Feldheim, B.W. Bowen // Journal of Heredity. – 2012. – Т. 103. – №. 5. – С. 617-629.
4. Gaither, M.R. High connectivity in the deepwater snapper *Pristipomoides filamentosus* (Lutjanidae) across the Indo-Pacific with isolation of the Hawaiian Archipelago / M.R. Gaither // PloS one. – 2011. – Т. 6. – №. 12. – С. e28913.
5. Gaither, M.R. Phylogeography of the reef fish *Cephalopholis argus* (Epinephelidae) indicates Pleistocene isolation across the Indo-Pacific Barrier with contemporary overlap in the Coral Triangle / M.R. Gaither // BMC evolutionary biology. – 2011. – Т. 11. – №. 1. – С. 189.
6. Ivanova, N.V. An inexpensive, automation friendly protocol for recovering high quality DNA / N.V. Ivanova, J.R. Dewaard,

- P.D.N. Hebert // Molecular ecology notes. – 2006. – Т. 6. – №. 4. – С. 998-1002.
7. Leis, J.M. Swimming ability and its rapid decrease at settlement in wrasse larvae (Teleostei: Labridae) / J.M. Leis, A.C. Hay, M.R. Gaither // Marine biology. – 2011. – Т. 158. – №. 6. – С. 1239-1246.
  8. Li, Y. Comparative analysis of different protocols for extraction of DNA from fish scales of *Cyprinus carpio* / Y. Li, Y. Gul, L. Cui, X. Cao, W. Wang // Indian Journal of Biotechnology. 2015. – Т. 14. – С. 382-387.
  9. McMurry, J. Organic chemistry. 6th edition. / J. McMurry. - Brooks Cole., 2003. – 654pp.
  10. Meissner, H. Evaluation of three methods for high throughput extraction of DNA from challenging fish tissues / H. Meissner, S.E. Fevolden, P.A. Amundsen, K. Præbel // Conservation Genetics Resources. – 2013. – Т. 5. – №. 3. – С. 733-735.
  11. Nagy, Z.T. A hands-on overview of tissue preservation methods for molecular genetic analyses / Z.T. Nagy // Organisms Diversity & Evolution. – 2010. – Т. 10. – №. 1. – С. 91-105.
  12. Sambrook, J. Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd ed. / J. Sambrook, D.W. Russell. - Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, 2001. – 1023 C.
  13. Steinke, D. The FISH-BOL collaborators' protocol / D. Steinke, R. Hanner // Mitochondrial DNA. – 2011. – Т. 22. – №. sup1. – С. 10-14.
  14. Szabó, Z. On the status of the Hawaiian seahorses *Hippocampus hilonis*, *H. histrix* and *H. fisheri* (Syngnathidae) / Z. Szabó, B.K. Kimokeo, R.J. Toonen, J.E. Randall // Marine Biology Research. – 2011. – Т. 7. – №. 7. – С. 701-709.
  15. Truett, G.E. Preparation genomic DNA from animal tissue / G.E. Truett // DNA Sequencing II: Optimizing Preparation and Cleanup. - 2006. - С. 33-47.
  16. Turtinen, L.W. Protein salting-out method applied to genomic DNA isolation from fish whole blood / L.W. Turtinen, B.D. Juran // Biotechniques. – 1997. – Т. 24. – С. 238-239.
  17. Zeugin, J.A. Ethanol precipitation of DNA / J.A. Zeugin, J.L. Hartley // Focus. – 1985. – Т. 7. – №. 4. – С. 1-2.
  18. Заславская, Н.И. Анализ полиморфизма ДНК и белков высших организмов: Учебно-методическое пособие к большо-

- му практикуму по генетике / Н.И. Заславская, Л.А. Скури-  
хина. – Владивосток: Изд-во Дальневост. ун-та., 2007. – 88  
с.
19. Поляничко, А.М. Электрофорез в агарозном геле: Учебно-  
методическое пособие / А.М. Поляничко. - Спб.: Из-во С.-  
Петербур. гос. ун-та., 2007. - 42 с.