

Литература

1. *Вышпольский Ф.Ф., Мухамеджанов Х.В.* Технологии водосбережения и управления почвенно-мелиоративными процессами при орошении. «Аква», Тараз, 2005, – 160 с.
2. *Ибатуллин С.Р., Бекбаев Р.К., Вышпольский Ф.Ф., Бекбаев У.К.* Методы водосбережения и снижения капиталовложений на реконструкцию оросительных систем. Водное хозяйство Казахстана, 2009, № 4, С 2-9
3. *Оразаев М.А.* Сводная информация по инвентаризации оросительных каналов и гидротехнических сооружений Южных регионов страны. Астана, 2009, – 13 с
4. Отчет о мелиоративном состоянии орошаемых земель Южно-Казахстанской области за 2008г. Шымкент, – 82 с.

Бекбаев Н.Р., Жапаркулова Е.Д., Ыкласов Д.

ОҢТҮСТІК ҚАЗАҚСТАННЫҢ СУҒАРЫЛАТЫН ЖЕРЛЕРІНДЕГІ СУ РЕСУРСТАРЫН БАСҚАРУ ЖӘНЕ ИРРИГАЦИЯЛЫҚ ЖҮЙЕЛЕРІНІҢ ТЕХНИКАЛЫҚ ЖАҒДАЙЫ

Аңдатпа

Материалдық-техникалық базаның болмауы мен жеке меншік тұлғалардың экономикалық мүмкіндіктерінің айырмашылықтары суару және қашыртқы-кәріз желілерді қайтадан техникалық жаңарту үшін қаржы ресурстарын құру қайшылықтарын тудырады.

Түйінді сөздер: суару, су ресурстары, суару суы, деградация процестері, қашыртқы-кәріз желісі.

Bekbaev N.R., Zhaparkulova E.D., Yklasov D.

TECHNICAL STATE OF IRRIGATION SYSTEMS AND WATER RESOURCES MANAGEMENT IN IRRIGATED LANDS OF SOUTHERN KAZAKHSTAN

Annotation

The lack of a material and technical base and the difference in the economic opportunities of individual property subjects create an insurmountable contradiction in the creation of financial resources for the technical reorganization of the irrigation and collector-drainage network.

Key words: irrigation, water resources, irrigation water, degradation processes, collector-drainage network.

УДК 581.14, 576.32/36

Бегзат А.Н., Қапасұлы Т., Амирбеков А.С., Накисбеков Н.О., Бишимбаева Н.К.

*РГП «Институт биологии и биотехнологии растений» КН МОН РК,
НИИ фундаментальной и прикладной медицины им. Б. Атчабарова (НИИФПМ)*

ПОЛУЧЕНИЕ ПРЕПАРАТОВ РНК КАЛЛУСНЫХ ТКАНЕЙ ПШЕНИЦЫ ДЛЯ ТРАНСКРИПТОМНОГО АНАЛИЗА

Аннотация

Проведена оптимизация условия получения тотальной РНК из модельных тканевых систем переключения программ морфогенеза для транскриптомного анализа. Получены препараты тотальной РНК из модельных тканевых систем транскриптомного анализа.

Ключевые слова: пшеница, морфогенез, соматический эмбриогенез, экспрессия юнигенов, транскриптомный анализ.

Введение

На сегодняшний день наиболее современным подходом изучения экспрессии генов является профилирование всего транскриптома. Клеточная идентичность определяется транскриптомом, то есть полным набором экспрессированных РНК-транскриптов. Профилирование всего транскриптома широко используется для оценки относительной экспрессии генов в клетках, тканях, организмах, или в различных условиях. Технологии секвенирования нового поколения (NGS) представляют собой современный подход определения последовательностей, значительно повышающих эффективность и скорость изучения транскриптов и геномных вариантов в генах. Применение технологий Illumina для секвенирования транскриптома организмов с завершенным геномом показал, что относительно короткие риды, произведенные с помощью такой технологии, можно эффективно использовать для обнаружения генов и сравнения профилей экспрессии [1]. Технология РНК секвенирования была использована для изучения экспрессии генов при соматическом эмбриогенезе арабидопсиса [2]. В этом исследовании было получено 426,001,826 сиквенсовых ридов, которые были картированы на 26,520 генов из референсного генома *A.thailana*. В эмбриональных культурах на стадиях развития 5 и 10 дней дифференциальную экспрессию показали 1195 генов. Из них 778 генов были с повышенной экспрессией после 5 дней, по сравнению 10-дневным вариантом [3]. Для выявления молекулярных маркеров с эмбриогенным потенциалом исследовались транскрипты эмбриогенных и неэмбриогенных тканей трех генотипов *P.balfouriana*. Было выявлено 1418 дифференциально экспрессируемых генов в эмбриогенных тканях в сравнении с неэмбриогенным вариантом. Результаты показали наличие 431 гена с повышенной экспрессией и 987 генов с пониженной экспрессией [4]. Также были исследованы транскрипты кукурузы [5], риса [6] и хлопчатника [7] при соматическом эмбриогенезе.

Технологии RNA-Seq также были использованы для изучения механизмов индукции микроспороного эмбриогенеза у ячменя [8] и пшеницы [9]. Несмотря на очевидный потенциал, методы секвенирования нового поколения еще не были использованы в изучении экспрессии генов при раннем соматическом эмбриогенезе пшеницы. Выявление молекулярных маркеров является очень важным направлением для биотехнологии растений и ранней селекции эмбриогенных культур с эмбриогенным потенциалом. В связи с этим, изучение экспрессии генов при переключении программы развития морфогенетически пластичных клеток на эмбриоидогенный путь развития в культуре тканей является очень актуальным.

Материалы и методы исследования

Объекты исследования: глобулярные каллусы пшеницы сорта Казахстанская-10 и глобулярные каллусы, перепрограммирующиеся на путь эмбриодогенеза. Морфологию каллусов изучали визуально и с использованием бинокулярного микроскопа МБС-10. Каллусные ткани фиксировали и получали гистологические срезы [10].

Для транскриптомного анализа была выделена тотальная РНК из тканей с различным уровнем дифференцировки: 1 вариант - 5Д (контроль, морфогенетически пластичные ткани), 2 вариант - 5Q2 (переключение на путь эмбриодогенеза), 3 вариант - 1 Q2 (переключение на путь эмбриодогенеза).

Выделение тотальной РНК из каллусных тканей пшеницы сорта Казахстанская 10 проводили согласно протоколу Qiagen RNeasy Plant Mini Kit и протоколу Trizol (Thermo scientific) [11].

Концентрацию и степень очистки полученных образцов РНК проверяли при волне 260/280 и 260/230 на спектрофотометре Nanodrop 2000. Электрофорез, и получение спектров, а также показатели целостности РНК (RIN) анализировали при помощи Agilent RNA 6000 Nano Kit на Биоанализаторе Agilent 2100 согласно протоколу [12].

Результаты исследований и их обсуждение

Объектами исследования служили длительно культивируемые глобулярные каллусные ткани (ГК) пшеницы сорта Казахстанская 10, клетки которых отличаются высокой пластичностью и, подобно ствольным клеткам, могут переключаться на любые существующие пути морфогенеза растений – ризогенез, геммогенез, образование сосудов, эмбриоидогенез. С целью индукции переключения морфогенетически пластичных клеток на путь эмбриоидогенеза ГК высаживали на среду с удвоенной концентрацией минеральных солей среды Мурасиге и Скуга (Q_2), что, по результатам гистологического исследования (рисунок 1), оказывает стрессовое влияние на клетки и вызывает переключение программы развития клеток на эмбриоидогенный путь развития [13]. Использовали два варианта среды с удвоенной концентрацией солей: $1Q_2$ - с 1,0 мг/л 2,4-Д, и $5Q_2$ - с 5,0 мг/л 2,4-Д. Длительность культивирования на стрессовых средах составляла 7 дней. В качестве контроля сужили исходные ГК, культивируемые на среде МС с 5,0 мг/л 2,4-Д ($5D$) с нормальным уровнем минеральных солей. Выделена тотальная РНК с различным уровнем дифференцировки: 1 вар. - $5D$ (контроль, морфогенетически пластичные ткани), 2 вар - $5Q_2$ (переключение на путь эмбриоидогенеза), 3 вар. - $1Q_2$ (переключение на путь эмбриоидогенеза) для транскриптомного анализа.

Тотальная РНК для транскриптомного анализа соответствовала следующим параметрам:

- 1) Тип образца: тотальная РНК;
- 2) Количество образца: для растительных экземпляров: общая РНК $\geq 2\mu\text{g}$;
- 3) Концентрация образца: для растительных экземпляров, концентрация $C \geq 50\text{ng}/\mu\text{l}$;
- 4) Чистота образца: $OD_{260/280} \geq 1.8$, $OD_{260/230} \geq 1.8$; для растительных экземпляров, РНК $28S:18S \geq 1.0$, число целостности РНК – RIN ≥ 6.5 .

В ходе оптимизации условия выделения тотальной РНК мы выбрали методы с использованием Qiagen RNeasy Plant Mini Kit и Trizol (Thermo scientific).

По протоколу RNeasy Plant Mini Kit. для оптимизации метода брали 140 мг, 150 мг, 160 мг свежих каллусов. В результате получили малые количества тотального РНК 2,8 нг/мкл, 3,6 нг/мкл, 3,8 нг/мкл. Аналогичные результаты получили каллусами весом 50 мг и 102 мг (9,3 нг/мкл и 6,3 нг/мкл). Поэтому для повышения количества и качества выделяемой тотальной РНК нами была оптимизирована методика выделения.

Тризольным методом первоначально мы получили из 90 мг и 100 мг каллуса концентрацию 100 нг/мкл тотальной РНК. Показатели качества РНК оценивали на спектрофотометре NanoDrop 2000.

Кроме того, показатели целостности РНК (RIN) анализировали с помощью Биоанализатора 2100 Agilent RNA 6000 Nano Kit.

В результате оптимизации нам удалось увеличить количество выделенной РНК до 74,1 нг/мкл и 87 нг/мкл (рисунок 2).

#	Sample ID	User name	Nucleic Acid Conc.	Unit	A260	A280	260/280	260/230	Sample Type	Factor
---	-----------	-----------	--------------------	------	------	------	---------	---------	-------------	--------

7	RNA_1	User	74,1	ng/μl	1,851	0,929	1,99	0,99	RNA	40,00
---	-------	------	------	-------	-------	-------	------	------	-----	-------

8	RNA_2	User	87,0	ng/μl	2,175	1,060	2,05	1,78	RNA	40,00
---	-------	------	------	-------	-------	-------	------	------	-----	-------

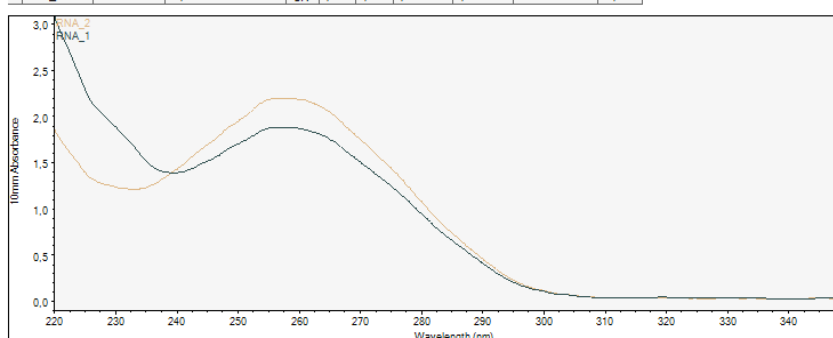


Рисунок 2 - Показатели тотальной РНК, выделенной Qiagen RNeasy Plant Mini Kit

На рисунке 3 видно, что концентрации РНК, выделенных тризолом выше, чем в предыдущих образцах. Но несмотря на хорошую концентрацию и хорошие показатели при волнах 260\280 половина из них не проявляла желаемых показателей при 230\260.

Sample ID	Nucleic Acid Conc.	Unit	A260	A280	260/280	260/230	Sample Type
-----------	--------------------	------	------	------	---------	---------	-------------

1	115,3	ng/μl	2,882	1,523	1,89	0,67	RNA
---	-------	-------	-------	-------	------	------	-----

2	103,8	ng/μl	2,595	1,377	1,88	0,67	RNA
---	-------	-------	-------	-------	------	------	-----

3	102,9	ng/μl	2,574	1,382	1,86	0,67	RNA
---	-------	-------	-------	-------	------	------	-----

4	122,9	ng/μl	3,072	1,576	1,95	1,35	RNA
---	-------	-------	-------	-------	------	------	-----

5	108,6	ng/μl	2,715	1,396	1,94	1,33	RNA
---	-------	-------	-------	-------	------	------	-----

6	107,4	ng/μl	2,684	1,368	1,96	1,21	RNA
---	-------	-------	-------	-------	------	------	-----

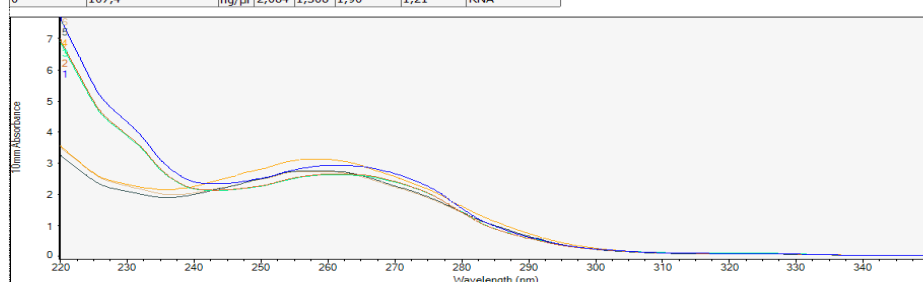


Рисунок 3 - Показатели тотальной РНК, выделенной реагентом Тризол

Для повышения показателя чистоты РНК по показателю 260\230 нам необходимо было оптимизировать этот метод. После ряда экспериментов нам удалось повысить не только качество, но и количество выделенной тотальной РНК, как показано на рисунке 3.

#	Sample ID	Nucleic Acid Conc.	Unit	A260	A280	260/280	260/230	Factor
---	-----------	--------------------	------	------	------	---------	---------	--------

1	RNA_1	2432,8	ng/μl	60,821	29,484	2,06	2,00	40,00
---	-------	--------	-------	--------	--------	------	------	-------

2	RNA_2	3141,7	ng/μl	78,542	38,183	2,06	1,84	40,00
---	-------	--------	-------	--------	--------	------	------	-------

3	RNA_3	1697,0	ng/μl	42,425	20,873	2,03	2,09	40,00
---	-------	--------	-------	--------	--------	------	------	-------

4	RNA_4	854,9	ng/μl	21,373	10,655	2,01	1,54	40,00
---	-------	-------	-------	--------	--------	------	------	-------

5	RNA_5	1257,8	ng/μl	31,445	15,450	2,04	1,77	40,00
---	-------	--------	-------	--------	--------	------	------	-------

6	RNA_6	2295,1	ng/μl	57,377	27,782	2,07	1,82	40,00
---	-------	--------	-------	--------	--------	------	------	-------

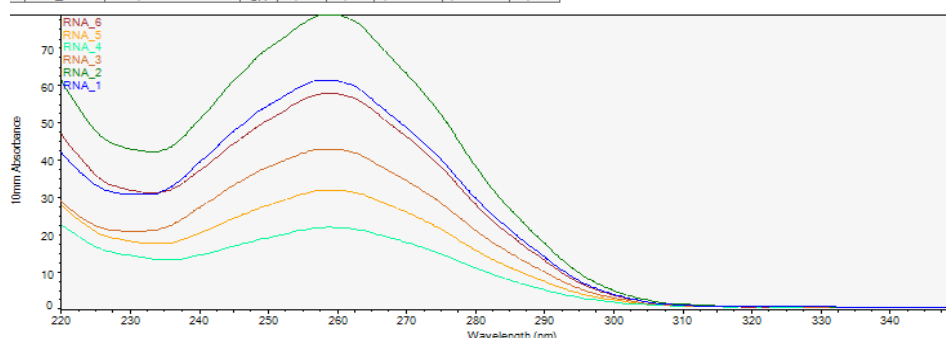


Рисунок 4 - Показатели тотальной РНК, выделенной тризолом.

С целью повышения качества некоторых образцов РНК была выделена повторно при помощи реагента Trizol. Из рисунка 4 можно увидеть то, все образцы показывают желаемые показатели. Показатели качества РНК при волне 260\280 и 260\230 у всех образцов выше 1,8. По этим показателям данные образцы удовлетворяют требованиям Beijing Genome Insitute.

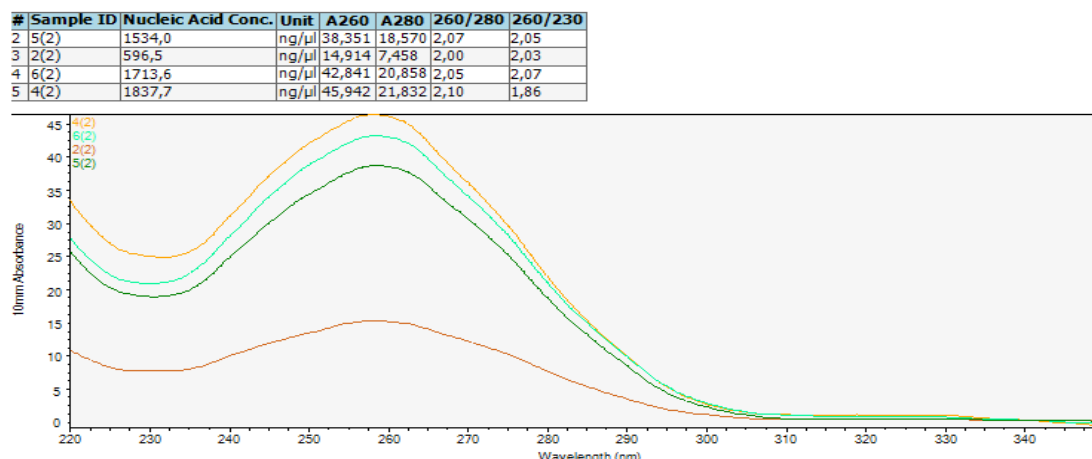


Рисунок 5 - Показатели тотальной РНК, выделенной реагентом Тризол

Далее для получения информации о целостности полученной тотальной РНК все образцы тотальной РНК были проанализированы на Биоанализаторе Agilent 2100 при помощи чипа Agilent RNA 6000 Nano Kit.

Как видно из полученных электрофореграмм, представленных на рисунках 4, 5 у образцов, выделенных при помощи RNeasy Plant Mini Kit рибосомальные РНК четко не разделены на пики, и рядом с ними присутствуют много более мелких пиков. Исходя из этих картин, основываясь на состоянии рРНК, можно сказать, что тотальная РНК разрушается. Об этом же свидетельствует малая величина показателя целостности РНК – RIN (таблица 1).

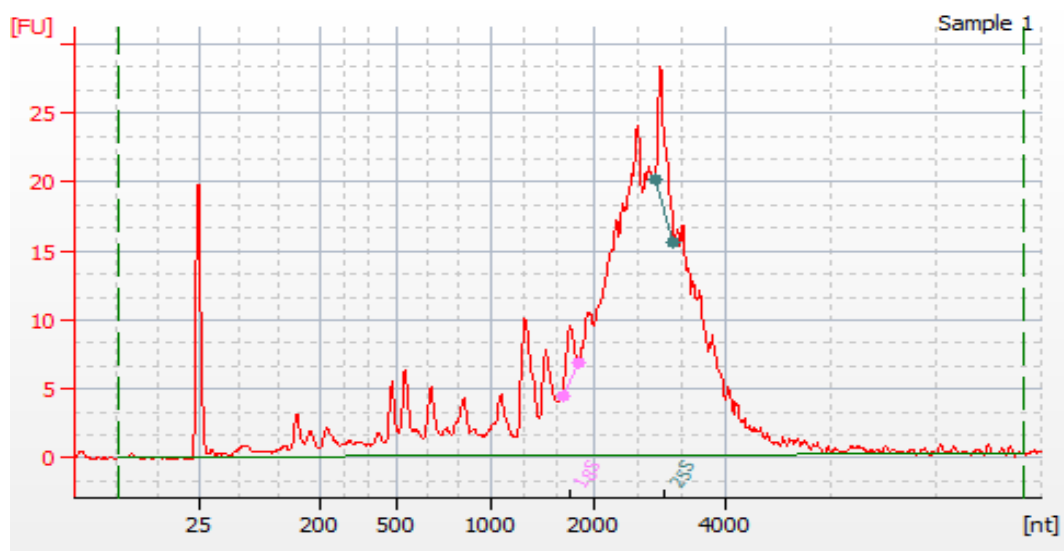


Рисунок 6 - Электрофореграмма РНК, образец 1

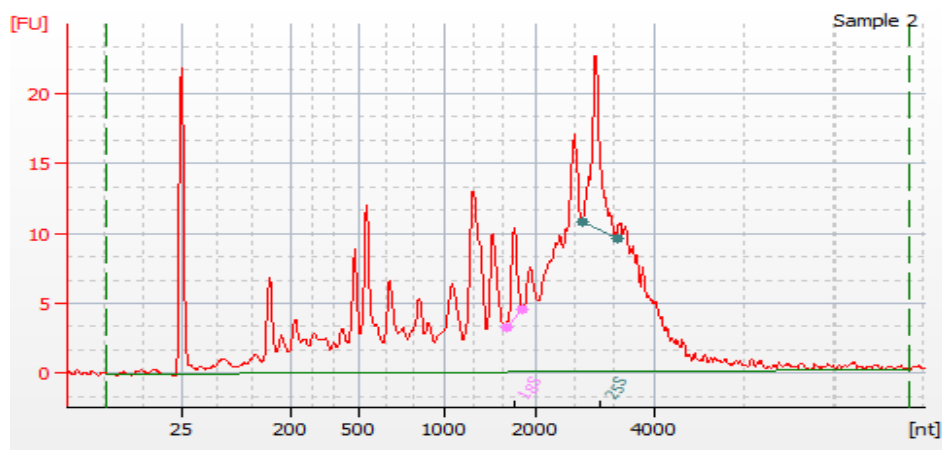


Рисунок 7 - Электрофореграмма РНК, образец 2

Как видно из таблицы 1, все образцы, полученные с использованием реагента Trizol, соответствуют требованиям Beijing Genome Institute. Во всех образцах, выделенным этим реактивом - №3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, число целостности РНК было больше 6,5. Также соотношение 28S:18S у всех образцов больше 1,0.

Образцы 1 и 2, для выделения которых использовали Qiagen RNeasy Plant Mini Kit, не подходят по качеству требованиям Beijing Genome Institute, т.к. показатель целостности РНК – RIN, у образца №1 равен 2,9 а у образца №2 - 3,7.

Таблица 1 – Результаты качества РНК, полученные на Биоанализаторе Agilent 2100

№ образца	Sample	rRNA Ratio [25s / 18s]:	RNA Integrity Number (RIN):
1	RNA_1 (kit)	2.2885	2.9
2	RNA_2 (Kit)	2.931531	3.7
3	RNA_1	1.889386	9.1
4	RNA_2	1.960834	9.3
5	RNA_3	1.95133	8.9
6	RNA_4	2.067122	8.6
7	RNA_5	2.154164	9.1
8	RNA_6	1.952266	9.7
9	RNA_4(2)	1.44995	6.8
10	RNA_5(2)	1.992287	8.1
11	RNA_2(2)	2.172055	8.7
12	RNA_6(2)	2.281389	9.6

Данные представленные на рисунке 10 также свидетельствует о правоте наших выводов. Тогда, как из общей электрофореграммы видно то, что у всех образцов 3-12 четко выражена 25S и 18S, у первых же двух образцов присутствуют кроме 25S и 18S другие фрагменты.

Далее из образцов тотальной РНК, отвечающих требованиям BGI, методом обратной транскрипции при помощи набора реагентов SuperScript III RT получили к ДНК.

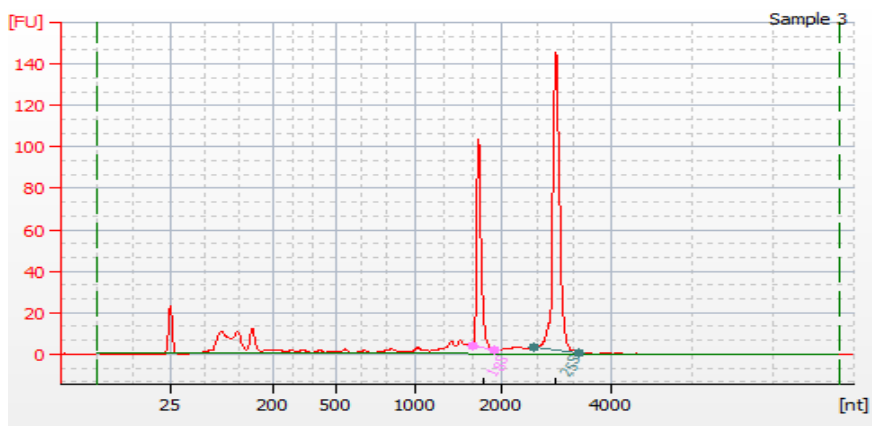


Рисунок 8 - Электрофореграмма РНК, образец 3

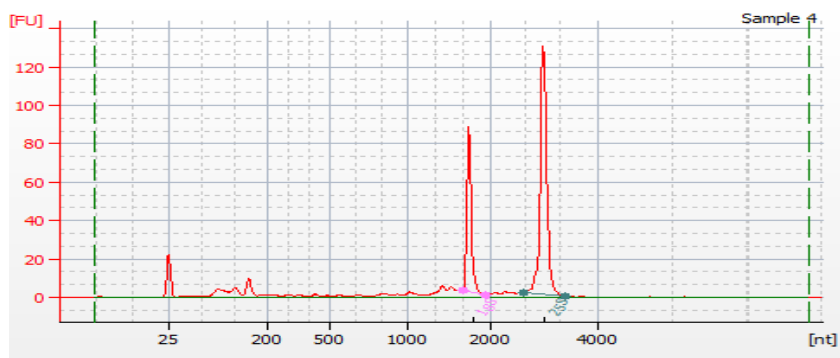


Рисунок 9 - Электрофореграмма РНК, образец 4

Полученные образцы, удовлетворяющие требованиям Beijing Genome Institute, отправлены для RNA-Seq (транскриптом) анализа. Транскриптомный анализ, который будет проведен в BGI, который включает конструирование библиотеки к ДНК, секвенирование и биоинформационный анализ.

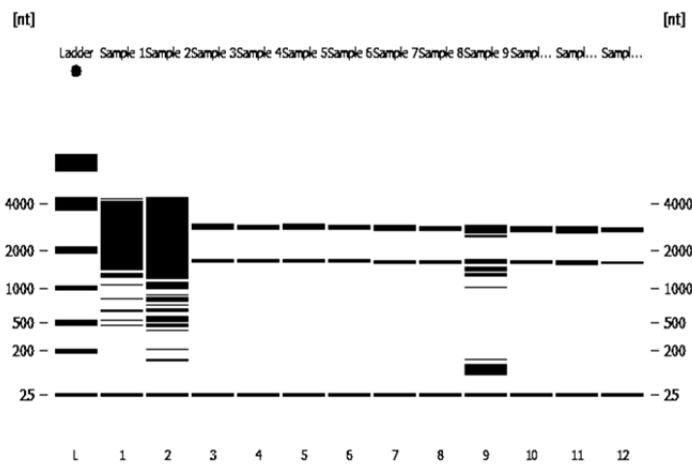


Рисунок 10 - Общая электрофореграмма для всех образцов

Таким образом, из полученных данных можно заключить, что образцы тотальной полученные реактивом Trizol отвечают требованиям Beijing Genome Insitute – $C \geq 50 \text{ ng}/\mu\text{l}$ $\text{OD}_{260/280} \geq 1.8$, $\text{OD}_{260}/$

230≥1.8; PHK 28S:18S≥ 1.0, RIN ≥6.5, и вполне могут служить матрицей для транскриптомного анализа каллусных тканей с различным типом цитодифференцировки.

В целом, по данной задаче созданы модельные тканевые системы морфогенетически пластичных тканей и эмбриогенных каллусов для транскриптомного анализа. Получены препараты тотальной РНК и к ДНК из модельных систем для транскриптомного анализа.

Литература

1. Berkman P.J., Lai K., Lorenc M.L.T., Edwards D. Next-generation sequencing applications for wheat crop improvement // American J. of Bot. – 2012. – Vol. 99. – №2. – P. 1
2. Li Q., Zhang Sh. and Wang J. Transcriptome analysis of callus from *Picea Balfouriana* // BMC Genomics. – 2014. – Vol. 15. – P. 553.
3. Salvo S.A.G.D., Hirsch C.N., Buell C.R., Kaeppler Sh.M., Kaeppler H.F. Whole transcriptome profiling of maize during early somatic embryogenesis reveals altered expression of stress factors and embryogenesis-related genes // PLOS ONE. – 2015. – Vol. 9. – P. 111407.
4. Grabherr M.G., Haas B.J., Yassour M., Levin J.Z., Thompson D.A., Amit I., Adiconis X., Fan L., Raychowdhury R., Zeng Q., Chen Z., Mauceli E., Hacohen N., Gnirke A., Rhind N., di Palma F., Birren B.W., Nusbaum C., Lindblad-Toh K., Friedman N., Regev A. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome // Nature biotechnology. -2011. -Vol. 29, № 7. - P. 644-652.
5. Pertea G., Huang X., Liang F., Antonescu V., Sultana R., Karamycheva S., Lee Y., White J., Cheung F., Parvizi B., Tsai J., Quackenbush J. TIGR Gene Indices clustering tools (TGICL): a software system for fast clustering of large EST datasets // Bioinformatics. -2003. -Vol. 19, № 5. - P. 651-652.
6. Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. Basic local alignment search tool // Journal of molecular biology. -1990. -Vol. 215, № 3. - P. 403-410.
7. Quevillon E., Silventoinen V., Pillai S., Harte N., Mulder N., Apweiler R., Lopez R. InterProScan: protein domains identifier // Nucleic acids research. -2005. -Vol. 33. - P. 116-120.
8. Jones P., Binns D., Chang H.Y., Fraser M., Li W., McAnulla C., McWilliam H., Maslen J., Mitchell A., Nuka G., Pesseat S., Quinn A.F., Sangrador-Vegas A., Scheremetjew M., Yong S.Y., Lopez R., Hunter S. InterProScan 5: genome-scale protein function classification // Bioinformatics. -2014. -Vol. 30, № 9. - P. 1236-1240.
9. Iseli C., Jongeneel C.V., Bucher P. ESTScan: a program for detecting, evaluating, and reconstructing potential coding regions in EST sequences // Proceedings. International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology. -1999. - P. 138-148
10. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. – Москва: Агропромиздат, 1988. – 272 с.
11. <https://www.qiagen.com/kz/resources/resourcedetail?id=246847e7-0095-43e4-8d1d-41df3f9153dd&lang=en> Manual of Trizol reagent
12. https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/trizol_reagent.pdf RNeasy Plant mini kit protocol.
13. Бишимбаева Н.К. Цитофизиологические основы биотехнологии длительной регенерации растений в культуре тканей зерновых злаков: автореф. ... докт. биол. наук. – Алматы, 2007. – 38 с.

Begzat A.N., Kapasuly T., Akimbekov A.C., Nagisbekov N. O., Bishimbayeva N.K.

*RGI «Plant biology and biotechnology» KH MOH PK,
Scientific Research Institute of Fundamental and Applied Medicine
named after B. Atchabarov (SRIFPAM)*

THE OBTAINING OF TOTAL RNA PREPARATIONS FROM MODEL
TISSUES FOR TRANSCRIPTOM ANALYSIS

Annotation

The condition of the optimization for obtaining total RNA from the model tissue tissues of switching morphogenesis programs for transcriptome analysis was carried out. Preparations of total RNA from model tissue systems of transcriptome analysis were have obtained.

Key words: wheat, morphogenesis, somatic embryogenesis, total RNA, transcriptom analysis.

Бегзат А.Н., Қарасұлы Т., Акимбеков А.С., Нагисбеков Н.О., Бишимбаева Н.К.

*РМК «Өсімдіктер биологиясы және биотехнологиясы институты» ҒК БҒМ ҚР,
Б. Атчабаров (НИИФПМ) атындағы фундаменталды және қолданбалы
ғылыми-зерттеу медицина институты*

ТРАНСКРИПТОМДЫ АНАЛИЗ ҮШІН БИДАЙ ҚАЛЛУС ҰЛПАСЫНАН РНҚ
ПРЕПАРАТТАРЫН АЛУ

Аңдатпа

Транскриптомды талдау үшін морфогенез бағдарламасын ауыстыра отырып модельді ұлпа жүйесінен оңтайландырылған жағдайда тоталды РНҚ алу жүргізілді. Транскриптомды талдау үшін модельді ұлпа жүздерінен тоталды РНҚ препараттарын алу.

Кілт сөздер: бидай, морфогенез, соматикалық эмбриогенез, тотал РНҚ транскриптомдық талдау.

ӘОЖ 592 (591.9.593.1)

Бөрібай Э.С.

КЕНЕПШӨП ҚҰРАМЫНДАҒЫ БИОЛОГИЯЛЫҚ БЕЛСЕНДІ ЗАТТАРДЫҢ
АНТИТОТЫҚТЫРҒЫШ ҚАСИЕТІ

Аңдатпа

Мақалада Шу алқабында өсетін кенепшөп құрамынан алынған биологиялық белсенді заттардың ағзада антиототықтырғыш қасиет көрсететіні анықталды.

Алынған нәтижелер бойынша каннабиноидтардың төмен концентрациялары эритроциттердің гемолиз деңгейін төмендетіп, протекторлық қасиет көрсетті. Тетрагидроканнабинолдың концентрациялары артқан сайын, эритроцит мембраналарының өткізгіштігі төмендейтіні анықталды.

Кілт сөздер: каннабиноидтар, гемолиз, эритроцит, мембрана, биопротектор, тетрагидроканнабинол, хромасомалық мутация, гемоглобин, антиототықтырғыш, гипотониялық ертінді.