

УДК 636.082.12:575.113.1

IRAP-PCR-МАРКЕРЫ У НЕКОТОРЫХ ПОРОД СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ВИДОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

М.А. ЕЛЬКИНА, В.И. ГЛАЗКО

(РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева)

В целях поиска надежных молекулярно-генетических маркеров (МГМ) для пород и видов крупного рогатого скота, овец, лошадей выполнен сравнительный анализ эффективности использования фрагментов ретротранспозонов для выявления породоспецифичных особенностей генофондов пород с.-х. видов животных. Идентифицированы и оценены полиморфизм по 28 и 25 фрагментам ДНК, фланкированным инвертированными терминальными участками ретротранспозонов SIRE-1 и PawS 5 соответственно. Выявленные генетические взаимоотношения соответствовали истории формирования сравниваемых видов и пород, т.е. их полиморфизм вовлекался в межвидовую и межпородную дифференциацию. Показано, что генотипирование с использованием IRAP-PCR-маркеров позволяет подбирать полилокусные сочетания, отличающие одну породу от другой, оценивать близость их происхождения и сравнительную консолидированность исследованных групп животных.

Ключевые слова: инвертированные терминальные участки ретротранспозонов, IRAP-PCR, полилокусное генотипирование, полиморфное информационное содержание, доля полиморфных локусов.

Биоразнообразие — необходимое условие для сохранения экосистем и биосферы в целом. Любое изменение внешних условий среды (климат, условия содержания, инфекционные заболевания и др.) может неблагоприятно сказаться на выживаемости вида, если последний характеризуется однообразием генофондов. Особенно остро данная проблема затрагивает с.-х. виды животных, целью селекционной работы с которыми являлась их консолидация внутри пород. В связи с этим встает необходимость сохранять генофонды местных пород как резерв генетического материала [5]. Тем не менее проблемы идентификации пород, внутривидовых групп с.-х. видов животных, оценок их происхождения и консолидированности зачастую не могут быть решены на уровне комплекса фенотипических признаков в связи с широкой изменчивостью последних и зависимости изменчивости большинства из них от действия факторов окружающей среды.

В последние несколько десятилетий разрабатываются методы геномного сканирования, позволяющие оценивать генетические структуры популяций по одновременному генотипированию в геномах большого количества генетических элементов [1]. Для выполнения таких исследований особый интерес представляют различные варианты мобильных генетических элементов (МГЭ) в связи с их широкой геномной представленностью и высоким уровнем полиморфизма [8, 10]. Обнаружено также, что отдельные представители МГЭ широко распространены и гомологичны им

фрагменты встречаются в геномах представителей удаленных таксонов, например, у разных классов позвоночных [7], растений и животных [11], а также других таксонов [9]. В наших предыдущих исследованиях было обнаружено, что использование в качестве праймеров в полимеразной цепной реакции (PCR) терминальных участков некоторых ретротранспозонов растений приводит к формированию спектров продуктов амплификации на матрицах геномной ДНК с.-х. видов животных [3]. В этой связи в настоящей работе выполнен сравнительный анализ эффективности использования фрагментов ретротранспозонов растений для выявления породоспецифичных особенностей генофондов различных пород с.-х. видов животных.

Материалы и методы

В исследования включены представители наиболее распространенных пород с.-х. видов животных, а также ряд аборигенных пород этих же видов (170 гол.): крупный рогатый скот (черно-пестрая порода, красный эстонский и якутский скот); лошади (русская рысистая, карачаевская и алтайская породы); овцы (эдилбаевская, калмыцкая и карачаевская породы). Для геномного полилокусного генотипирования рассматривался полиморфизм фрагментов ДНК, фланкированных инвертированными участками растительных ретротранспозонов (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism — IRAP-PCR-маркеры) [4]. В качестве праймеров в PCR были использованы участки ретротранспозонов LTR SIRE-1 (GCA-GTT-ATG-CAA-GTG-GGA-TCA-GCA) — терминальный повтор ретротранспозона сои [6], и Paws 5 (AAC-GAG-GGG-TTC-GAG-GCC) — зерновых [2]. Геномную ДНК выделяли из цельной крови коммерческим набором «ДНК-экстракт 1» («Синтол», Россия). PCR проводили на амплификаторе «Терцик» (Россия) с применением смеси ПЦР-РВ («Синтол», Россия). Условия и стадии проведения ПЦР: первоначальная денатурация 94°C — 2 мин, денатурация 94°C — 30 с, отжиг 55°C — 30 с, элонгация 72°C — 2 мин, заключительная элонгация 72°C — 10 мин, 35 циклов. Анализ результатов амплификации проводили методом электрофореза в 1,5%-м агарозном геле с применением в качестве маркера молекулярных масс ДНК GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus (MBI Fermentas, USA) для оценки длины продуктов. Визуализацию продуктов ПЦР-амплификации проводили под УФ-излучением после окрашивания гелей бромистым этидием.

Математическая обработка осуществлялась с использованием компьютерной программы TFPGA. Расчет индекса PIC (Polymorphic Information Content) выполнялся по формуле для диаллельных локусов, для которых $PIC = 2f(1 - f)$, где f — частота одного из двух аллелей. PIC рассчитывали в двух вариантах: для одного локуса (фрагмента ДНК определенной длины, $PIC_{\text{локуса}}$) и среднее значение по всему спектру продуктов амплификации ($PIC_{\text{ср}}$).

Результаты и их обсуждение

Выполнен сравнительный анализ генетических структур пород на основании оценок полиморфизма 28 фрагментов ДНК различной длины, полученных в спектрах продуктов амплификации (ампликонов) с использованием в PCR в качестве праймера терминального повтора LTR SIRE-1 (рис. 1), а также 25 ампликонов при применении в PCR праймера Paws 5 (рис. 2), суммарно 53 локуса ДНК. В полученных спектрах присутствуют фрагменты ДНК в диапазоне длин 1500-300 п.о. (праймер LTR SIRE-1), 1300-480 п.о. (праймер Paws).

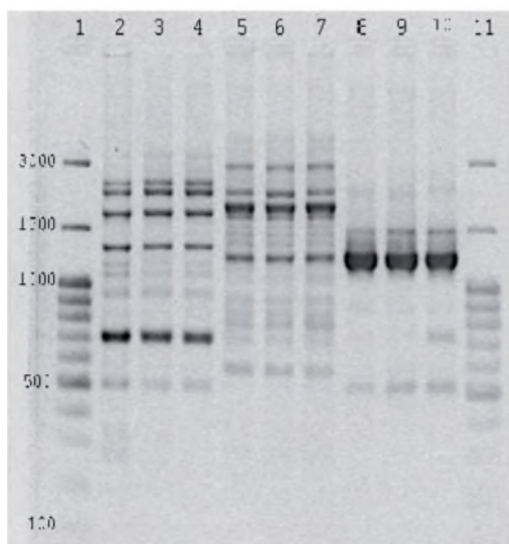


Рис. 1. Электрофоретические спектры ДНК, полученные в результате IRAP-PCR с использованием в качестве праймера терминального участка ретротранспозона LTR SIRE-1: 1, 11 — маркер молекулярных масс; 2, 3, 4 — крупный рогатый скот; 5, 6, 7 — овцы; 8, 9, 10 — лошади

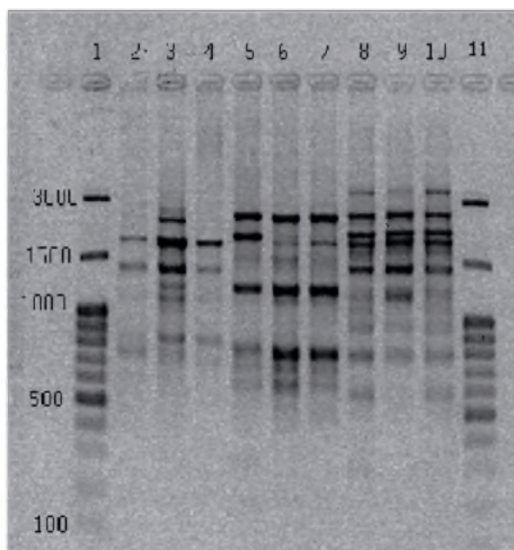


Рис. 2. Электрофоретические спектры ДНК, полученные в результате IRAP-PCR с использованием в качестве праймера терминального участка ретротранспозона PawS 5: 1, 11 — маркер молекулярных масс; 2, 3, 4 — крупный рогатый скот; 5, 6, 7 — овцы; 8, 9, 10 — лошади

Генетическую структуру породы оценивали по полиморфному информационному содержанию ($PIС_{cp}$), по доле полиморфных локусов. На основании оценок полиморфизма ампликонов рассчитывали значения генетических расстояний (DN, M. Nei, 1978) между группами исследованных животных, на основе которых были построены дендрограммы.

В результате получены следующие данные. У алтайской лошади по сравнению с другими группами оказались самые высокие значения доли полиморфных локусов по праймерам LTR SIRE-1 и PawS 5, соответственно 82%, 23%, а также полиморфное информационное содержание ($PIС_{cp}$) — 0,260, 0,050. По $PIС_{cp}$ более высокое значение было обнаружено только у карачаевской лошади по спектру ампликонов праймера PawS 5 (0,076). Самые низкие значения этих показателей обнаружены у русской рысистой породы лошадей, что соответствует ее принадлежности к заводским породам и относительно большей консолидированности: у лошадей этой породы доля полиморфных локусов по праймерам LTR SIRE-1 и PawS 5 была соответственно 7%, 13%, $PIС_{cp}$ — 0,031, 0,049 (таблица).

В спектрах ампликонов, полученных по праймеру LTR SIRE-1, у всех животных исследуемых пород лошадей присутствовали два консервативных фрагмента ДНК длиной 1350 и 1250 п.о. Самыми редкими фрагментами оказались фрагменты длиной 790 п.о., они присутствовали только у лошадей алтайской породы. Фрагменты длиной 580 и 420 п.о. отсутствовали у карачаевских лошадей, тогда как у рысистой породы полиморфизм наблюдался именно в локусе фрагментов длиной 420 п.о.

Доля полиморфных локусов и полиморфное информационное содержание (PIC) пород крупного рогатого скота, овец и лошадей в спектрах IRAP-PCR-маркеров

Порода	LTR SIRE — 1		PawS 5	
	доля полиморфных локусов (%)	PIC _{ср}	доля полиморфных локусов (%)	PIC _{ср}
Алтайская лошадь	82	0,260	20	0,096
Рысистая лошадь	7	0,031	13	0,049
Карачаевская лошадь	39	0,167	15	0,108
Карачаевская овца	25	0,092	50	0,195
Эдильбаевская овца	31	0,140	33	0,11
Калмыцкая овца	44	0,187	47	0,199
Черно-пестрый скот	7	0,091	33	0,108
Якутский скот	7	0,062	47	0,214
Красный эстонский скот	21	0,076	47	0,178

(PIC_{локуса} = 0,465), причем по этому локусу значение PIC_{локуса} оказалось у лошадей этой породы в 10 раз выше, чем у алтайских лошадей (PIC_{локуса} = 0,043).

В спектрах ампликонов, полученных по праймеру PawS 5, у карачаевской лошади, в отличие от других лошадей, отсутствовали фрагменты ДНК длиной 900 и 690 п.о. По локусу в 1080 п.о. у карачаевских лошадей наблюдался высокий полиморфизм (PIC_{локуса} = 0,494), в то время как фрагмент этой длины присутствовал у всех без исключения лошадей пород алтайской и рысистой.

Наиболее высокими значениями доли полиморфных локусов и PIC_{ср} по сравнению с другими породами овец отличалась калмыцкая овца (P = 44%, 47%, PIC_{ср} = 0,187, 0,174, по праймерам LTR SIRE-1 и PawS 5, соответственно) (см. таблицу). В спектрах ампликонов, полученных с праймером LTR SIRE-1, у всех животных исследуемых пород овец присутствовали шесть консервативных фрагментов длиной в диапазоне от 1500 до 710 п.о. Самыми редкими оказались ампликоны длиной 760 п.о. и 460 п.о. Первый встречался только у карачаевской (PIC_{локуса} = 0,075), у калмыцкой и эдильбаевской пород овец данный фрагмент отсутствовал, а второй — только у калмыцкой овцы (PIC_{локуса} = 0,499). У карачаевской овцы отсутствовал фрагмент длиной 1130 п.о., у калмыцкой овцы — фрагмент длиной 1200 п.о. В спектрах ампликонов, полученных с праймером PawS 5, фрагмент длиной 950 п.о. присутствовал только у карачаевских овец (PIC_{локуса} = 0,075).

Среди пород крупного рогатого скота спектр ампликонов, полученных в PCR с праймером LTR SIRE-1, суммарно по всем локусам существенно не отличался между крупным рогатым якутским скотом и черно-пестрой породой по показателям значений доли полиморфных локусов и PIC_{ср} (7% и 7%; 0,061 и 0,091 соответственно). Однако в спектре ампликонов по праймеру PawS 5 значение PIC у якутского скота оказалось в 2 раза выше, чем у черно-пестрого (0,202 и 0,108 соответственно), а доля полиморфных локусов была равна 43% и 33% соответственно (см. таблицу). Можно ожидать, что относительно повышенный полиморфизм у якутской породы обусловлен ее принадлежностью к аборигенным животным, где особи не столь однородны, как у заводских пород и, кроме этого, якутский скот воспроизводится в достаточно суровых климатических условиях (край ареала вида), что может способствовать повышенному генетическому разнообразию. Красный эстонский скот

по данным параметрам оказался близок к якутскому — $PIС_{cp} = 0,066$, $P = 19\%$ (по праймеру LTR SIRE-1); $PIС_{cp} = 0,167$, $P = 44\%$ (по праймеру PawS 5) (см. таблицу).

В спектрах ампликонов, полученных с праймером LTR SIRE-1, у всех животных исследуемых пород крупного рогатого скота присутствовали девять консервативных фрагментов длиной в диапазоне от 1300 до 330 п.о. Самым редким фрагментом оказался ампликон длиной 380 п.о. ($PIС_{локуса} = 0,137$) — он встречался только у красного эстонского скота. В спектрах ампликонов, полученных с праймером PawS 5, полиморфизм в основном наблюдается в районе относительно тяжелых (длинных) фрагментов ДНК.

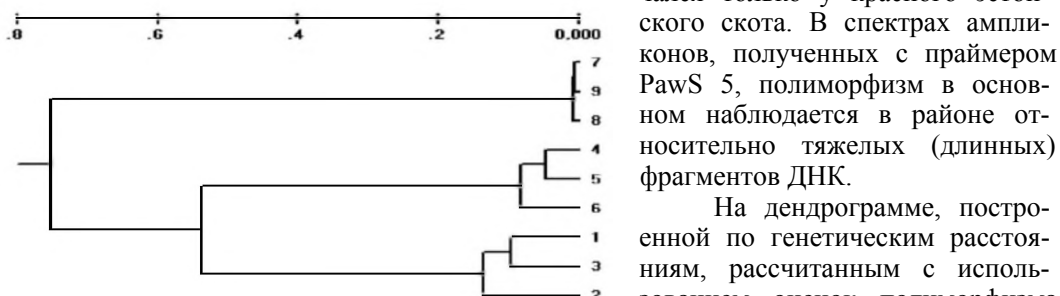


Рис. 3. Дендрограмма, построенная на основании генетических расстояний, рассчитанных по частотам встречаемости генотипов по 28 локусам, полученных в спектрах продуктов амплификации (ампликонов) с использованием в PCR в качестве праймера терминального повтора LTR SIRE-1 между следующими группами животных: 1 — лошади алтайские, 2 — рысаки, 3 — карачаевские лошади, 4 — карачаевские овцы, 5 — эдильбаевские овцы, 6 — калмыцкие овцы, 7 — черно-пестрый скот, 8 — якутские коровы, 9 — красный эстонский скот

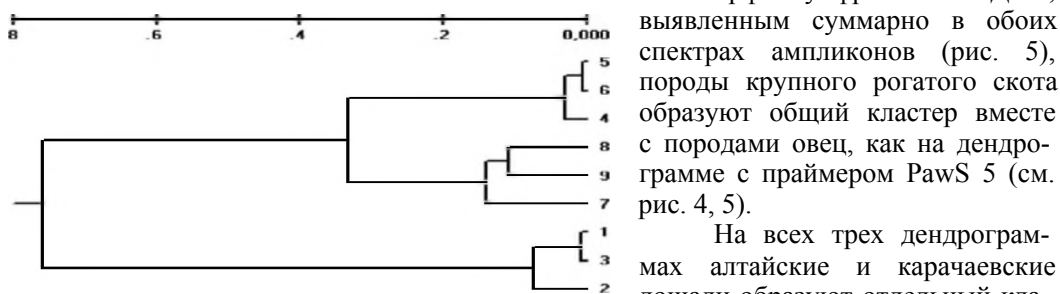


Рис. 4. Дендрограмма, построенная на основании генетических расстояний, рассчитанных по частотам встречаемости генотипов по 25 локусам, полученных в спектрах продуктов амплификации (ампликонов) с использованием в PCR в качестве праймера терминального повтора PawS 5 между следующими группами животных: 1 — лошади алтайские, 2 — рысаки, 3 — карачаевские лошади, 4 — карачаевские овцы, 5 — эдильбаевские овцы, 6 — калмыцкие овцы, 7 — черно-пестрый скот, 8 — якутские коровы, 9 — красный эстонский скот

На дендрограмме, построенной по генетическим расстояниям, рассчитанным с использованием оценок полиморфизма продуктов амплификации ДНК с применением в качестве праймера LTR SIRE-1, общий кластер образуют лошади и овцы (рис. 3). В случае спектров ампликонов праймера PawS 5 общий кластер образуют крупный рогатый скот и овцы (рис. 4). На дендрограмме, построенной по генетическим расстояниям, рассчитанным по полиморфизму фрагментов ДНК, выявленным суммарно в обоих спектрах ампликонов (рис. 5), породы крупного рогатого скота образуют общий кластер вместе с породами овец, как на дендрограмме с праймером PawS 5 (см. рис. 4, 5).

На всех трех дендрограммах алтайские и карачаевские лошади образуют отдельный кластер, а рысистые лошади находятся обособленно, что соответствует истории происхождения этих пород.

Породы овец формируют общие кластеры по-разному, в зависимости от применяемого праймера для получения спектра ампликонов. Так, карачаевские и эдильбаевские овцы образуют

один кластер по спектрам ампликонов, полученных с праймером LTR SIRE-1 (см. рис. 2), а с праймером PawS 5 общий кластер образуют эдильбаевские и калмыцкие овцы (см. рис. 3), что в большей степени соответствует истории происхождения пород (эдильбаевская порода была получена путем скрещивания казахских курдючных овец с крупными калмыцкими баранами).

Черно-пестрый скот и якутские коровы образуют общий кластер по ампликонам спектра праймера LTR SIRE-1, отдельно от красного эстонского скота (см. рис. 3), а по спектрам ампликонов праймера PawS 5 общий кластер формируют якутский и эстонский скот (см. рис. 4). Их близость в последнем случае может быть обусловлена тем, что, как и якутский, красный эстонский скот обладает высоким генетическим разнообразием вследствие ее улучшения быками голштинской, англеской и красной датской пород, тогда как черно-пестрый скот относительно более консолидирован.

Полученные данные свидетельствуют о том, что межвидовая и межпородная дифференциация исследованных групп животных, оцененная по полиморфизму спектров продуктов амплификации, полученных в PCR с праймером PawS 5, лучше соответствует известным межвидовым взаимоотношениям и историям формирования пород, включенным в анализ, по сравнению со спектрами праймера LTR SIRE-1. Можно ожидать, что наблюдаемые отличия обусловлены разным временем интеграции гомологичных последовательностей в геномы рассмотренных видов.

Чтобы оценить возможность локализации в геноме крупного рогатого скота участков ДНК, гомологичных LTR SIRE-1, с помощью программы BLASTn выполнен их поиск в секвенированных последовательностях ГенБанка. Участки с частичной гомологией (более 60%) обнаруживаются в секвенированных последовательностях 20 из 29 аутосом крупного рогатого скота, а также в хромосомах X и Y. В базе данных экспрессирующихся последовательностей выявлены гомологичные участки в мРНК ряда генов, кодирующих регуляторные и сигнальные белки, а также белки, ассоциированные с теламерами (танкираза, TNKS), плазматической и ядерными мембранами, (ламинин альфа 1, LAMA1, аттрактинподобный белок 1-ATRNL1; спектринсодержащий повтор белка ядерной оболочки 1-SYNE1) и участвующие в иммунной защите организма от инфекционных заболеваний (Т-клеточный рецептор альфа, TCRA; один из семейства белков ранней стадии воспаления — TLR3). Кроме того, короткие участки гомологии выявляются в ряде микроРНК, экспрессирующихся в геноме крупного рогатого скота: bta-mir-2303 (хромосома 12); bta-mir-2356 (хромосома 2); bta-mir-2480 (хромосома 9); bta-mir-2441 (хромосома 5). Известно, что микроРНК широко представлена в разных геномах, участвует в регуляции ген-

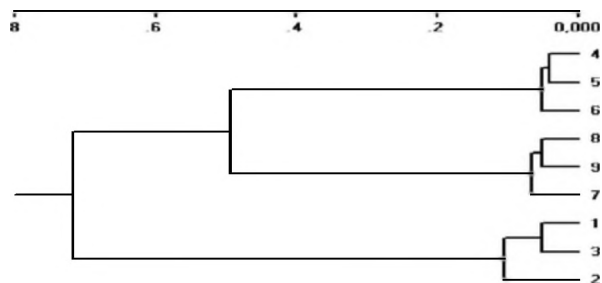


Рис. 5. Дендрограмма, построенная на основании генетических расстояний, рассчитанных по частотам встречаемости генотипов по 53 локусам суммарно, полученных в спектрах продуктов амплификации (ампликонов) с использованием в PCR в качестве праймера терминального повтора PawS 5 и LTR SIRE-1 между следующими группами животных: 1 — лошади алтайские, 2 — рысаки, 3 — карачаевские лошади, 4 — карачаевские овцы, 5 — эдильбаевские овцы, 6 — калмыцкие овцы, 7 — черно-пестрый скот, 8 — якутские коровы, 9 — красный эстонский скот

ной экспрессии и в определенной степени ассоциирована с вирусными инфекциями. Участки гомологии также обнаруживаются и в геномах прокариот.

С использованием программы BLASTn выполнен соответствующий поиск для фрагмента PawS 5 гомологичных последовательностей в ГенБанке. Обнаружено большое количество участков с частичной гомологией к этому фрагменту. Как правило, они локализованы в участках полигенного семейства P450 и генов, связанных с функцией иммунной системы, факторов регуляции транскрипции. Участки гомологии к флангу PawS 5 имеют несколько более широкую таксономическую представленность, чем для фланга LTR SIRE-1, что может свидетельствовать в пользу предположения о разном времени их геномной интеграции.

Выводы

Полилокусное генотипирование с использованием терминальных участков ретротранспозонов LTR SIRE-1 и PawS 5 позволяет получать спектры фрагментов ДНК разной длины, полиморфизм которых обнаруживает выраженные отличия между генофондами исследованных пород лошадей, крупного рогатого скота и овец. У лошадей наиболее высокий уровень полиморфизма наблюдался по спектрам ампликонов, полученных с праймером LTR SIRE-1. у овец и крупного рогатого скота — с праймером PawS 5. Кластеризация животных по значениям генетических расстояний, рассчитанных на основании полиморфизма ампликонов, полученных с праймером PawS 5, хорошо соответствовала таксономической близости исследованных видов и истории происхождения пород, в отличие от оценок, полученных с праймером LTR SIRE-1. Однако их совместное использование позволяет более надежно выявлять генофондные породоспецифические особенности. Предполагается, что наблюдаемые отличия в спектрах продуктов амплификации, полученных с применением в качестве праймеров фрагментов LTR SIRE-1 и PawS 5, по их участию в межвидовой и межпородной дифференциации могут быть обусловлены разным временем интеграции соответствующих последовательностей в геномы предковых видов. В пользу этого предположения свидетельствуют полученные данные о более широкой распространенности последовательностей, гомологичных терминальному фрагменту PawS 5 по сравнению с LTR SIRE-1 в секвенированных последовательностях разных таксонов в ГенБанке.

Библиографический список

1. Глазко В.И., Глазко Т.Т. Ландшафтная геномика // Известия ТСХА, 2010. Вып. 5. С. 130-143.
2. Глазко В.И., Цветков П.П., Иванов А.Н. Генетическая дифференциация сортов риса по IRAP маркерам // Известия ТСХА, 2006. Вып. 4. С. 155-159.
3. Глазко Т.Т., Архипов П.П., Глазко В.И. Популяционно-генетические последствия экологических катастроф на примере Чернобыльской аварии. М.: ФГОУ ВПО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, 2008. 556 с.
4. Календарь Р.В., Глазко В.И. Типы молекулярно-генетических маркеров и их применение // Физиология и биохимия культурных растений, 2002. Т. 34. № 4. С. 279-296.
5. Состояние всемирных генетических ресурсов животных в сфере продовольствия и сельского хозяйства. М.: ВИЖРАСХН, 2010. 540 с. /Пер. с англ. FAO, 2007.
6. KalendarR., Schulman A.H. IRAP and REMAP for retrotransposon-based genotyping and fingerprinting // Nat Protoc, 2006. V. 1. № 5. P. 2478-2484.
7. Kordis J., GubensekF. Unusual horizontal transfer of a long interspersed nuclear element between distant vertebrate classes //Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998. V 95. P. 10704-10709.
8. Mei I., DingX., Tsang S.-Y. et al. AluScan: a method for genome-wide scanning of sequence and structure variations in the human genome // BMC Genomics, 2011. V 12: 564.
9. Thomas J., Schaack S., Pritham E.J. Pervasive Horizontal Transfer of Rolling-Circle Transposons among Animals // Genome Biol. Evol. V. 2. P. 656-664.

10. *Witherspoon D.J., Xing Zhang Y et al.* Mobile element scanning (ME-Scan) by targeted high-throughput sequencing // BMC Genomics, 2010. V. 11: 410

11. *Yang L., Bennetzen J.L.* Structure-based discovery and description of plant and animal Helitrons // Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2009. V 106. P. 12832-12837.

Рецензент — д. с.-х. н. С.Н. Белопухов

SUMMARY

In order to find reliable molecular genetic markers (MGM) for both species and breeds of cattle, sheep and horses, a comparative analysis of efficient use of plant retrotransposons fragments to identify specific features of gene pools in different breeds of farm animals has been carried out. Polymorphism of 28 and 25 DNA fragments flanked by inverted terminal parts of retrotransposons SIRE-1 and PawS 5, respectively, is identified and evaluated. The identified genetic relationship corresponds to the history of the formation of species and breeds that is their polymorphism has been involved in the interspecific and interbreeding differentiation. The studies show that genotyping using IRAP-PCR markers provides an opportunity to choose combination of poliloci that could distinguish one breed from another, to evaluate the origins and consolidation of the investigated groups of animals.

Key words: inverted terminal parts of retrotransposons, IRAP-PCR, polyloci genotyping, polymorphic information content, the share of polymorphic loci.

Елькина Мария Александровна — аспирант Центра нанобиотехнологий РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; e-mail: mariyaelkina@yahoo.com).

Глазко Валерий Иванович — д. с.-х. н., руководитель Центра нанобиотехнологий РГАУ-МСХА имени К. А. Тимирязева (e-mail: vglazko@yahoo.com).