

БИОТЕХНОЛОГИЯ, СЕЛЕКЦИЯ И СЕМЕНОВОДСТВО ПОЛЕВЫХ КУЛЬТУР

Известия ТСХА, выпуск 1, 2012 год

УДК 575.174.015.3:599.723

ВИДОСПЕЦИФИЧНЫЕ ISSR-PCR-МАРКЕРЫ И ПУТИ ИХ ФОРМИРОВАНИЯ

В.И. ГЛАЗКО, А.В. ФЕОФИЛОВ, Н.В. БАРДУКОВ, Т.Т. ГЛАЗКО

(РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева)

Выполнены секвенирование и анализ нуклеотидной последовательности фрагмента ДНК, фланкированного инвертированным повтором (AG)_nC, присутствие которого отличало спектры ISSR-PCR-маркеров домашней лошади от полученных у крупного рогатого скота и овец с такими же флангами. Обнаружено, что этот видоспецифичный фрагмент является результатом рекомбинаций между участками древних мобильных элементов (ДНК транспозона рыбы, эндогенного ретровируса млекопитающих ERV3) и специфичной для лошадей последовательности эндогенного ретровируса ERV1. Полученные данные свидетельствуют о непосредственном участии мобильных генетических элементов в дифференциации генофондов не только между видами, но и, по-видимому, между породами сельскохозяйственных видов животных.

Ключевые слова: ISSR-PCR-маркеры, инвертированные повторы ДНК, мобильные генетические элементы, эндогенные ретровирусы.

Успехи в секвенировании геномов млекопитающих, аннотирование секвенированных последовательностей, в т.ч. и сельскохозяйственных видов, оказали существенное влияние на развитие таких направлений, как селекция с помощью маркеров (Marker Assistant Selection — MAS). Выяснение закономерностей полиморфизма различных геномных элементов становится необходимым условием для их эффективного применения в целях выявления молекулярно-генетических маркеров, ассоциированных с формообразованием [9]. Особое значение такие исследования имеют для выявления надежных полилокусных геномных маркеров «генофондного стандарта» пород с.-х. видов. Попытки применения генотипирования мультилокусных спектров для решения традиционных проблем совершенствования имеющихся пород, контроля их консолидации и ряда других задач разрабатываются достаточно давно, однако до сих пор это направление остается недостаточно разработанным [4].

Нами ранее были выполнены сравнительные исследования полилокусных спектров фрагментов геномной ДНК, фланкированных инвертированными повторами микросателлитов (Inter-Simple Sequence Repeats — ISSR-PCR-маркеры), у ряда пород крупного рогатого скота, овец [1] и лошадей [2]. Обнаружено, что полилокусные спектры ISSR-PCR-маркеров имеют выраженные породо- и видоспецифические особенности. Генетические расстояния, рассчитанные на основании таких спектров,

соответствовали известным межвидовым и межпородным взаимоотношениям, т.е. изменчивость геномного распределения инвертированных повторов микросателлитов каким-то образом вовлекается в формообразовании, в частности, в дифференциацию генофондов между видами. Для выяснения возможных механизмов такого процесса в настоящей работе выполнены секвенирование и анализ участка ДНК длиной в 424 нуклеотида, фланкированного инвертированным повтором (AG)₉C, присутствие которого в спектрах ISSR-PCR-маркеров отличает спектры исследованных пород лошадей от крупного рогатого скота и овец. Получены данные, свидетельствующие о том, что появление видоспецифичных ISSR-PCR маркеров может быть следствием рекомбинаций между различными мобильными генетическими элементами, возникающими на ранних этапах расхождения генофондов от предковых видов.

Материалы и методы

Для выделения фрагментов ДНК, фланкированного инвертированными повторами (AG)₉C, использовали стандартную методику для выделения суммарной ДНК из клеток крови лошадей Алтайской породы, а также ISSR-PCR-анализа, разработанную Зеткевичем с соавторами с некоторыми модификациями [2, 13]. Электрофоретический анализ продуктов амплификации проводили с использованием 1,5%-го агарозного геля в 1x TBE-буфере с добавлением бромистого этидия до конечной концентрации 0,5 мкг/мл со следующими параметрами: сила тока 100 мА, напряжение 100 В в течение 1,5 ч. Для визуализации использовался источник ультрафиолета — трансиллюминатор УВТ-1 («Биоком», Россия). Размеры фрагментов ДНК определяли при помощи маркера молекулярных масс 100 bp + 1.5 Kb + 3 Kb (12 фрагментов от 100 до 3000 пар оснований) M27 (СибЭнзим, Россия).

Из полученного агарозного геля выделяли участок с фрагментом ДНК длиной в 420-450 пар оснований (п.о.) с помощью набора для элюции ДНК из агарозных гелей Diatom DNA Elution (Изоген, Россия) в соответствии с рекомендациями производителя. Для постановки ПЦР с элюированного фрагмента ДНК использовался следующий праймер: CAG-CTG-CAG-AGA-GAG-AGA-GAG-AGA-GC (с 5' конца добавлен сайт для рестриктазы PstI). Применялась следующая программа амплификации: первичная денатурация (t = 94°C, 2 мин); денатурация (t = 94°C, 30 с), отжиг (t = 55°C, 30 с), элонгация (t = 72°C, 50 с) — 20 циклов; финальная элонгация (t = 72°C, 5 мин). Далее выполнялось переосаждение 3М ацетатом натрия с промывкой 80%-м этанолом, рестрикция ферментом PstI в общем объеме 30 мкл (15 мкл ПЦР-продукта, 3 мкл 10x буфера, 3 мкл рестриктазы, 9 мкл бидистиллированной воды). После инактивации рестриктазы в течение 10 мин при 70°C переосаждали 3М ацетатом натрия и добавляли в плазмиду pUC19, обработанную PstI. Лигирование производилось ДНК лигазой из фага T4 (СибЭнзим, Россия): в течение ночи при температуре 14°C. Лигат переосаждали ацетатом натрия и смесью фенол-хлороформ (1:1). Для трансформации использовали компетентные клетки штамма *E. Coli* JM109, подготовленные по стандартной методике. Трансформацию проводили с помощью электропоратора Eppendorf (1730 В, 4,5 мс), затем инкубировали 1 ч при +37°C в среде 2YT и высевали на чашки Петри (2YT, X-Gal, IPTG, ампициллин). Выполняли селекцию колоний: включивших вставку (белые) отделяли от невключивших (голубые) и пересевали с помощью иглы. Колонии инкубировали в течение ночи при +37°C, затем доращивали до оптической плотности 0,6-0,8, после чего выделяли ДНК плазмид по стандартной методике (с использованием лизоцима и сахарозы, гидроксида натрия и SDS, ацетата калия, хлорида кальция). Плазмидную ДНК очищали с помощью ацетата натрия и

этанола, затем обрабатывали рестриктазами с дальнейшей проверкой в агарозном геле длины вставок. В выбранные пробы (150-200 нг) добавляли праймеры к фагу M13 (3,2 пкмоль). Секвенирование ДНК проводили с помощью набора реактивов ABI PRISM® BigDye™ Terminator v. 3.1 с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе ДНК ABI PRISM 3730 Applied Biosystems.

Секвенирование ДНК проводили в Межинститутском Центре коллективного пользования «ГЕНОМ» ИМБ РАН (<http://www.genome-centre.narod.ru/>), организованном при поддержке РФФИ.

Поиск гомологичных последовательностей в GenBank осуществлялся с помощью алгоритмов семейства BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Инvertированные повторы внутри секвенированного фрагмента выявляли с использованием программы <http://mobyle.genouest.org/cgi-bin/Mobyle/>, поиск гомологии в архиве повторов проводили с применением программ <http://www.repeatmasker.org/>, <http://www.girinst.org/censor/>.

Результаты и их обсуждение

В результате выполненного клонирования и секвенирования получен фрагмент ДНК длиной в 424 п.о. На его концах находятся инvertированные последовательности повтора (AG)₉C. (AG)₉C соответствует праймеру, который использовался в полимеразной цепной реакции (PCR) для получения продуктов амплификации геномной ДНК алтайских лошадей.

Поиск гомологии в ГенБанке секвенированных последовательностей млекопитающих с использованием алгоритмов семейства BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) не позволил обнаружить полной гомологии всего фрагмента среди секвенированных участков. Выделяются три основные группы фрагментов с почти полной гомологией — с позиции 5 по 49 выделенного фрагмента ДНК в ряде участков генома домового мыши (*Mus musculus*), примерно с 51 по 176 нуклеотид — в группе секвенированных последовательностей генома человека (*Homo sapiens*), и самый длинный участок гомологии в секвенированном фрагменте ДНК, начиная с 186 по 423 позицию, обнаруживался в секвенированных последовательностях генома домашней лошади (*Equus caballus*).

Поиск гомологии в архивах высокоповторенных последовательностей млекопитающих с помощью программ RepeatMasker (<http://www.repeatmasker.org/>) и Giri (<http://www.girinst.org/censor/>) позволил получить следующие данные. В результате анализа с использованием программы RepeatMasker выявлено два участка гомологии. Первый участок — от позиции 50 до 186 анализируемого фрагмента ДНК алтайских лошадей в 424 п.о. к участку от позиции 584 до позиции 445 эндогенного вируса млекопитающих с длинными концевыми повторами 3 (LTR/ERV1-MaLR). При сравнении в анализируемом участке по сравнению с соответствующей последовательностью ELV 3 обнаружено две делеции (в 2 и 1 нуклеотид) 21 транзигция и 14 трансверсий, процент дивергенции — 25,6 (рис. 1).

Второй участок гомологии имел протяженность в анализируемой последовательности от 186 нуклеотида до 423 к последовательности фрагмента эндогенного ретровируса с длинными концевыми повторами ERV 1 от 1 нуклеотида до 236 (рис. 2).

В анализируемом участке по сравнению с последовательностью ERV 1 наблюдается 4 делеции (3 — в один нуклеотид и 1 — в 4 нуклеотида), 16 транзигции и 6 трансверсий, процент дивергенции — 9,4.

UnnamedSequen	50	TCTATCGCTGTGTAGCAAATCACCT--AATTTAATCTTATAAAACAATT	97
		i i i i i-- i i vvi ii	
C MLT1G3#LTR/ER	584	TCTATTGCTGCGTAACAAACCACCCAAAACCTTAGTGGCATAAAACAACC	535
UnnamedSequen	98	ATTTTATTATTCTAATGGACTCTGTGCATCAGGAATTCGAGAGGATTTA	147
		v v i i vi v v iivi	
C MLT1G3#LTR/ER	534	ATTTTATTATGCTCACGGATTCTGTGGGTGAGGAATTCGGACAGGGCACA	485
UnnamedSequen	148	TTGGGCATGGCTTGGACTCTGTTCT-TGATGGCATGGACCT	186
		vi v v i i-i v vv i	
C MLT1G3#LTR/ER	484	GCGGGGATGGCTTGTCTCTGCTCCACGATGTCTGGGGCCT	445

Рис. 1. Гомология последовательности анализируемого фрагмента ДНК алтайских лошадей в 424 п.о. от позиции 50 до 186 к участку от позиции 584 до позиции 445 эндогенного вируса млекопитающих с длинными концевыми повторами 3 (LTR/ERV1-MaLR)

UnnamedSequen	186	TAATACTGACCCTGATAACAGTTTCCCTACATTAACCCAGCATATATAC	235
		i i v i iv	
ERV1-1N-EC_LT	1	TGATACCGACCCTGATATCAGTTTCCCCACATTAACCCAGCATATATGG	50
UnnamedSequen	236	GGTTAAACCAAACACTCATTCCTGCTTACTCTCTGGCTTCCTGGCTC	285
ERV1-1N-EC_LT	51	GGTTAAACCAAACACTCATTCCTGCTTACTCTCTGGCTTCCTGGCTC	100
UnnamedSequen	286	CAGAATCCACTATCCTGCATG-AGACAGACACCACCAAGGACAAGCACCT	334
		v - i	
ERV1-1N-EC_LT	101	CAGAATCCACTATCCTCCATGGAGACAGACACCGCCAAGGACAAGCACCT	150
UnnamedSequen	335	GAATTCACTATCTCCTCCATACAAAGCAATACAGGC-AGTGGGAA-GCTG	382
		i i vii vi -i -	
ERV1-1N-EC_LT	151	GGATTCATTATCTCCTCCCCGAAAGAGATACAGGCTGGTGGGAAAGCTG	200
UnnamedSequen	383	CTGACAAATAAGGCCATGGGCTCTCTCTCTCTCTCTGCA	423
		v ii i i i -----	
ERV1-1N-EC LT	201	CTGACCAGCAAGGTCACGGGCTCCCTC-----CTCTCTGCA	236

Рис. 2. Гомология последовательности анализируемого фрагмента ДНК алтайских лошадей в 424 п.о. от позиции 186 до 423 к участку от позиции 1 до позиции 236 эндогенного вируса млекопитающих с длинными концевыми повторами 1 (LTR/ERV1)

Предполагается, что эндогенные ретровирусы непосредственно происходят от экзогенных ретровирусов, и их рекомбинации выполняют существенную роль в геномной эволюции [7]. Эндогенные ретровирусы млекопитающих подразделяются на три класса в зависимости от их происхождения от экзогенных ретровирусов, которая оценивается на основании гомологии последовательностей. Так, для ERV класса I предполагается тесная связь с ретровирусами *Gammctretrovirus u lips Pan re Iro vin is*; для ERV класса II — *Alpharetrovirus*, *Betaretrovirus*, *Deltaretrovirus*, и *Lentivirus*; для ERV класса III — с *Spiimcnis* [6].

В ряде исследований отмечается, что эффективность поисков гомологии высокоповторенных последовательностей может зависеть от выбранных баз данных и программы анализа (например, [5]). В этой связи нами был выполнен поиск гомологий секвенированного фрагмента ДНК алтайских лошадей, фланкированных инвертированным повтором (AG)₉C с использованием базы данных и программы Giri

(<http://www.girinst.org/censor/>). Получены следующие данные. Как и в случае использования алгоритмов BLASTn, выделяются три участка гомологии, один — с 5 нуклеотида по 43, второй — с 50 нуклеотида по 170, третий — с 186 нуклеотида по 423. Первый участок совпадает с 39 нуклеотидами ДНК транспозона, наблюдавшегося еще в геноме выделенного из *Danio rerio* [3]. Второй участок гомологии соответствует консенсусу участка длинного терминального повтора ретровирус-подобного элемента млекопитающих, ERV3 (Mammalian long terminal repeat, MLT1G2 subfamily — a consensus) в обратном направлении, от 579 нуклеотида до 454 (25% дивергенции). Впервые был описан в геноме человека [10]. И третий фрагмент со степенью дивергенции 4% соответствует лидирующему участку предположительно неавтономного эндогенного ретровируса ERV 1 лошади [8].

Таким образом, суммарно все поиски гомологии секвенированной последовательности геномного фрагмента ДНК, фланкированного инвертированным повтором (AG)₉C, длиной в 424 нуклеотида, свидетельствуют о том, что этот фрагмент представляет собой результат рекомбинации между древними мобильными элементами (ДНК транспозоном рыб и типичным для многих видов млекопитающих LTR ERV3) и специфической для генома лошади последовательности эндогенного ретровируса ERV1. Участок секвенированной последовательности ДНК алтайской лошади длиной в 231 нуклеотид обнаруживал гомологию в базах данных повторов только с ERV 1 домашней лошади, что свидетельствует об относительно более позднем его формировании по сравнению в частности, с участком гомологии к LTR ERV3. Последовательность расположения участков гомологии представлена на рисунке 3.

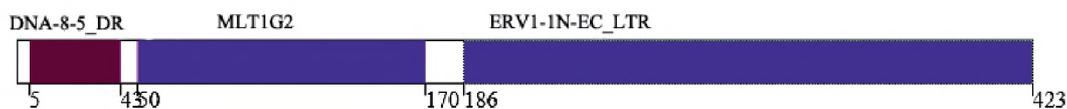


Рис. 3. Участки гомологии в секвенированной последовательности фрагмента ДНК генома домашней лошади, фланкированного инвертированным повтором (AG)₉C, длиной в 424 нуклеотида: 5-43 — фрагмент неавтономного ДНК транспозона рыбы; 50-170 — фрагмент LTR ERV 3, описанный в геноме человека; 186-423 — фрагмент LTR ERV1, специфичный для генома домашней лошади

Для того чтобы оценить особенности распространения выделенного участка LTR ERV 1 в геноме домашней лошади, с использованием алгоритмов семейства BLASTn и программы Map Viewer (Equus caballus (horse) genome view) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) выполнен поиск районов его интеграции на хромосомах домашней лошади. Получены следующие данные. Собственно последовательность ERV1-1-EC LTR распределена относительно регулярно на хромосомах лошади, примерно по одной последовательности на одну хромосому (рис. 4). Однако часть секвенированной последовательности, гомологичная лидирующему участку этого эндогенного ретровируса, имеет совершенно иную картину распределения.

Сопоставление частот локализации фрагмента секвенированной последовательности длиной в 231 нуклеотид с длиной хромосом позволило обнаружить тесную связь между ними ($r=0,93$, $P<0,001$; таблица). Полученные данные свидетельствуют о том, что у домашней лошади происходит дальнейшие транспозиции, рекомбинации и эволюция эндогенных ретровирусных последовательностей. Интересно отметить, что сходные данные о корреляции частот интеграции участков эндогенных ретрови-

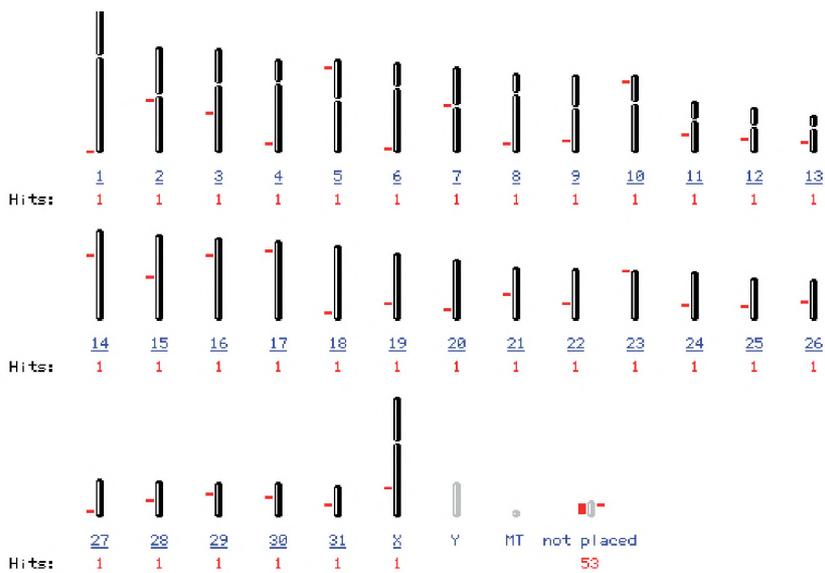


Рис. 4. Распределение последовательности ERV1-1-EC_LTR на хромосомах домашней лошади

Длина хромосом (в млн.п.о.) лошади и количество участков гомологии в них к фрагменту LTR ERV1 длиной в 231 п.о.

Номер хромосомы	Размер хромосомы, млн п.о.	Число гомологичных участков к фрагменту LTR ERV1	Отношение размера хромосом к числу гомологичных участков к фрагменту LTR ERV1
1	2	3	4
1	185,8	64	2,90
2	120,9	43	2,81
3	119,5	43	2,78
4	108,6	41	2,65
5	99,7	54	1,85
6	84,7	31	2,73
7	98,5	41	2,40
8	94,1	39	2,41
9	83,6	25	3,34
10	84,0	47	1,79
11	61,3	32	1,92
12	33,1	14	2,36
13	42,6	30	1,42
14	93,9	39	2,41
15	91,6	40	2,29
16	87,4	33	2,65
17	80,8	29	2,78

1	2	3	4
18	82,5	22	3,75
19	60,0	22	2,73
20	64,2	29	2,21
21	57,7	24	2,41
22	49,9	22	2,27
23	55,7	14	3,98
24	46,7	21	2,23
25	39,5	16	2,47
26	41,9	15	2,79
27	40,0	17	2,35
28	46,2	27	1,71
29	33,7	11	3,06
30	30,1	13	2,31
31	25,0	8	3,12
X	124,1	47	2,64

русных последовательностей и длинами хромосом наблюдались в геноме крупного рогатого скота [5]. Авторами этой работы отмечалось, что участки интеграции таких последовательностей часто были объединены последовательностями GC и обогащены — AT. В наших исследованиях также наблюдалась предпочтительная локализация мест интеграции фрагмента ERV1 в участках, в которых на цитогенетических картах наблюдались гетерохроматиновые блоки. Относительно регулярное распределение по длине хромосом лошади описано также для участков, гомологичных фрагменту длинного концевой повтора эндогенного ретровируса ERV3 beta1 [11].

Таким образом, в результате выполненных исследований обнаружено, что видоспецифичный для лошади фрагмент ДНК, отличающий спектр продуктов амплификации ISSR-PCR-маркеров домашней лошади от типичного для крупного рогатого скота и овец, сформирован путем рекомбинаций между участками древних мобильных элементов и более поздним вариантом ERV1, распространившимся по всему геному домашней лошади. Отсутствие полной гомологии этого фрагмента среди секвенированных последовательностей генома лошади породы тортонбред [12] позволяет предполагать породоспецифичность такой рекомбинации, что может быть использовано в дальнейшем для создания базы молекулярно-генетических маркеров «генофондного стандарта» пород лошадей.

Библиографический список

1. Глазко В.И., Феофилов А.В., Столповский Ю.А., Глазко Т.Т. Структурно-функциональные особенности микросателлитов в геномах крупного рогатого скота и овец // Доклады РАСХН, 2011. № 1. С. 41-45.
2. Феофилов А.В., Бардуков Н.В., Глазко В.И. Дифференциация генофондов алтайской и рысистых пород лошадей по ISSR-PCR маркерам // Генетика, 2011. Т. 37. № 9. С. 1230-1235.
3. Bao H., Jurka J. DNAtransposons from zebrafish // Repbase Reports, 2008. Vol. 8. № 11. P. 1720.
4. Flori I., Fritz S., Jaffrezic F., Boussaha M. et al. The Genome Response to Artificial Selection: A Case Study in Dairy Cattle // PLoS ONE, 2009. Vol. 4. № 8. e6595.

5. Garcia-Etxebarria K., Jugo B.M. Genome-Wide Detection and Characterization of Endogenous Retroviruses in *Bos Taurus* III. *Virology*, 2010. Vol. 84. P. 10852-10862.
6. Gifford, R., Kabat P., Martin J. et al. Evolution and distribution of class II-related endogenous retroviruses // *J. Virol.*, 2005. Vol. 79. P. 6478-6486.
7. Jem R, Coffin J. Effects of retroviruses on host genome function // *Annu. Rev. Genet.*, 2008. Vol. 42. P. 709-732.
8. Jurka J. Putative non-autonomous ERV1-type endogenous retrovirus from horse // *Rebase Reports*, 2008. Vol. 8. № 5. P. 601.
9. Kostia S., Ruohonen-Lehto M., Vainola R., Van'io S.L. Phylogenetic information in inter-SINE and inter-SSR fingerprints of the artiodactyla and evolution of the bovine S // *Heredity*, 2000. Vol. 84. Pt 1. P. 37-45 позиции.
10. Smit A.F. Identification of a new, abundant superfamily of mammalian LTR-transposons // *Nucleic Acids Res.*, 1993. Vol. 21. № 8. P. 1863-1872.
11. Van der Kuyl A.C. Characterization of a Full-Length Endogenous Beta-Retrovirus, EqERV-Betal, in the Genome of the Horse (*Equus caballus*) // *Viruses*, 2011. Vol. 3. P. 620-628.
12. Wade C.M., Giulotto E., Sigurdsson S. et al. Genome sequence, comparative analysis, and population genetics of the domestic horse // *Science*, 2009. Vol. 326. № 5954. P. 865-867.
13. Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. Genome fingerprinting by sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification // *Genomics*, 1994. Vol. 20. P. 176-183.

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

SUMMARY

The analysis of nucleotide sequences of DNA fragment, flanking by the invert repeat (AG)_nC which presence distinguished the ISSR-PCR spectra of the horse breed from received in genomes of cattle and sheep breeds with the same flanks was carried out. It was revealed that the analyzed fragment appeared to be the result of recombinations between ancient mobile elements (DNA transposon of fish, endogenous mammalian retrovirus ERV3) and sequence which was specific to horse endogenous retrovirus ERV1. The obtained data testified the direct participation of mobile genetic elements in differentiation of gene pools not only between species, but also, apparently, between breeds of farm animal species.

Key words: ISSR-PCR markers, inverted DNA repeats, mobile genetic elements, endogenous retroviruses.

Глазко Валерий Иванович — д. с.-х. н., руководитель Центра нанобиотехнологий РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; e-mail: vglazko@yahoo.com).

Феофилов Антон Владимирович — научн. сотр. Центра нанобиотехнологий РГАУ-МСХА имени К. А. Тимирязева.

Бардуков Николай Владимирович — стажер Центра нанобиотехнологий РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (e-mail: bardukv_nikolajj@mail.ru).

Глазко Татьяна Теодоровна — д. с.-х. н., проф. каф. разведения и племенного дела РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (тел. (499) 976-34-34; e-mail: tg1azko@rambler.ru).