

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ФРАГМЕНТОВ ДНК, ФЛАНКИРОВАННЫХ ИНВЕРТИРОВАННЫМИ ПОВТОРАМИ ДИ- И ТРИНУКЛЕОТИДНЫХ МИКРОСАТЕЛЛИТОВ, В ГЕНОМАХ СЕРОГО УКРАИНСКОГО СКОТА

В.И. ГЛАЗКО, Ю.А. СТОЛПОВСКИЙ*, А.В. ФЕОФИЛОВ, Н.В. КОЛ*

(Центр нанобиотехнологий)

Выполнен сравнительный анализ полиморфизма 102 локусов у животных серой украинской породы, выявляемых в полимеразной цепной реакции при использовании в качестве праймеров фрагментов четырех тринуклеотидных и двух динуклеотидных микросателлитных локусов. Обнаружены выраженные отличия количества продуктов амплификации, их длин и полиморфизма в зависимости от корового мотива микросателлитного фрагмента. Полностью консервативными оказались спектры ампликонов праймера $(GA)_6C$, наиболее изменчивыми — праймера $(ACC)_6G$. В спектре праймера $(ACC)_6G$ наблюдаются отличия между коровами и быками серой украинской породы. Обсуждается необходимость поиска геномных участков, оценки полиморфизма которых могут служить объективной характеристикой изменчивости и консолидированности генофондов, а также их уникальности у исследуемых групп животных.

Ключевые слова: ДНК-полиморфизм, инвертированные повторы, микросателлиты, ISSR-PCR-маркеры, серый украинский скот.

Глобальное распространение племенного материала ограниченного количества заводских пород приводит к вытеснению местных, аутохтонных, более древних пород. Обеднение генофондов видов с.-х. животных, связанных с таким вытеснением, уменьшает их адаптивную пластичность и потенциальную возможность обеспечения постоянно возникающих новых задач в селекционной работе. Все это приводит к необходимости разработки генетически обоснованных программ по сохранению и рациональному использованию генофондов с.-х. видов. Особого внимания заслуживают генофонды наиболее древних пород как потенциальный источник генов и генных ансамблей, необходимых для компенсации снижения внутривидового разнообразия.

Серая украинская порода крупного рогатого скота относится к древним породам, предположительно, остаткам промежуточной формы между диким предковым видом туром и всеми современными европейскими породами крупного рогатого скота, берущими начало от Средиземноморского центра доместикации [1 - 3]. К сожалению, в настоящее время эта порода находится на грани исчезновения, что и обуславливает очевидную важность детальных исследований генофонда немногих животных, сохранившихся до сих пор.

В популяционно-генетических исследованиях достаточно давно обсуждается возможное значение средней гетерозиготности для прогноза устойчивости популяции. Предполагается, что популяция имеет некий «оптимум»

* Институт общей генетики имени Н.И. Вавилова РАН.

гетерозиготности, отклонения от которого могут сигнализировать о процессах генофондной деградации [4, 5]. Эти предположения были сделаны на основании анализа полиморфизма структурных генов, в основном по гетерозиготности электрофоретических вариантов белков и ферментов.

В последние годы в популяционной генетике широкое использование получили новые методы прямого исследования полиморфизма различных участков ДНК, такие как оценки полиморфизма фрагментов рестрикции (RFLP), микросателлитных локусов (SSR), фрагментов ДНК, фланкированных инвертированными повторами случайных декануклеотидов (RAPD), или последовательностей микросателлитов (ISSR). Преимущества последних двух методов обусловлены тем, что они позволяют получать многолокусные и высокополиморфные спектры фрагментов генома, однако к их недостаткам следует отнести доминантный характер наследования.

Относительно повышенный (по сравнению со структурными генами) полиморфизм ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat) маркеров может быть обусловлен высокой частотой мутирования по микросателлитным локусам, которые используются в качестве праймеров в полимеразной цепной реакции (PCR). Так, по опубликованным данным [6], частота мутационных событий по микросателлитным локусам в среднем в 1000 раз выше, чем по структурным генам. ISSR-PCR-маркеры характеризуются широким спектром продуктов амплификации (ампликонов), каждый из которых рассматривается как отдельный локус. Принято считать, что микросателлитные локусы относительно равномерно распределены по всему геному и широко представлены как в кодирующих, так и не кодирующих последовательностях [7]. Поэтому оценка полиморфизма полилокусных спектров фрагментов ДНК, фланкированных инвертированными

повторами микросателлитных локусов, может более объективно отражать внутривидовое генетическое разнообразие, чем полиморфизм одиночных структурных генов или микросателлитных локусов.

Для того чтобы оценить внутривидовую размах изменчивости по генетическому разнообразию у серого украинского скота, в настоящей работе выполнены исследования полилокусных спектров, полученных в полимеразной цепной реакции (PCR) с использованием в качестве праймеров фрагментов ди- и тринуклеотидных микросателлитных последовательностей, отличающихся коровыми мотивами (ISSR-PCR-маркеры).

Материалы и методы

В анализ включены образцы крови животных серой украинской породы (34 гол., животные содержались в хозяйстве заповедника Аскания-Нова, с. Маркеево, Херсонской обл., а также 45 гол. — в биосферном заповеднике Черга, Республика Алтай).

Для оценки полиморфизма фрагментов ДНК, фланкированных инвертированными повторами микросателлитных локусов [8], в качестве праймеров использовали четыре фрагмента тринуклеотидных микросателлитных локусов — (ACC)6G, (GAG)6C, (AGC)6G, (CTC)6C и два динуклеотидных микросателлитных локуса (AG)9C и (GA)9C. Геномную ДНК выделяли из лимфоцитов периферической крови животных по стандартной методике [7]. Продукты амплификации получали, используя принятую для PCR методику [8]. Разделяли ампликоны по молекулярной массе в 0,8 и 2%-м агарозных гелях методом горизонтального электрофореза, используя для окраски фрагментов ДНК раствор бромистого этидия. Визуализацию фрагментов ДНК проводили в УФ свете. Размеры фрагментов ДНК определяли при помощи маркера молекулярных масс

0,1-кБ(тысяч пар нуклеотидов) DNA Ladder (Gibco BRL).

Математическую обработку данных выполняли, используя компьютерную программу «Statistica».

Результаты и обсуждение

Генетическая структура животных серой украинской породы была проанализирована с использованием ISSR-PCR-маркеров (фрагментов ДНК, фланкированных инвертированным повтором участка микросателлитного локуса, используемого в PCR в качестве одного праймера). В результате получали спектры продуктов амплификации (ампликонов) последовательностей ДНК, «анонимных» по нуклеотидной последовательности (за исключением их флангов), локализации в геноме и биохимической функции. Один ампликон спектра рассматривали как один локус ДНК. Полиморфизм такого локуса оценивали по наличию или отсутствию ампликона соответствующей длины в спектрах.

При использовании четырех тринуклеотидных праймеров в ISSR-PCR спектрах наблюдали от 8 до 32 ампликонов. Наибольшее количество ампликонов располагалось в пределах длин 2600 — 520 п.о. Ампликоны спектра условно можно разделить на следующие группы: наибольшей длины — 3250-1550 п.о., промежуточной — 1550—1000 п.о. и легкие фрагменты — 1000—330 п.о. Отмечается неодинаковая представленность ампликонов этих групп у исследованных животных в зависимости от нуклеотидной последовательности участка микросателлитного локуса, взятого в качестве праймера в ISSR-PCR. Так, при использовании в качестве праймера последовательностей $(ACC)_6G$ и $(AGC)_6G$ отмечается тенденция к относительно повышенной встречаемости ампликонов малой длины, последовательности $(GAG)_6C$ — наблюдается отчетливое преобладание в спектрах легких по массе ампликонов, а при использовании в качестве

праймера фрагмента микросателлитного локуса $(CTC)_6C$ обнаруживается относительно увеличенное количество ампликонов из области длин в 3250-1550 п.о. (табл.1).

Таблица 1

Процентное соотношение ампликонов разной длины в спектрах ISSR-PCR у серой украинской породы крупного рогатого скота при использовании в качестве праймеров фрагментов тринуклеотидных микросателлитных локусов

Длина ампликонов	%
<i>Праймер $(ACC)_6G$</i>	
3250–1550	25
1550–1000	31
1000–320	44
<i>Праймер $(GAG)_6C$</i>	
3250–1550	24
1550–1000	35
1000–320	41
<i>Праймер $(AGC)_6G$</i>	
3250–1550	38
1550–1000	19
1000–320	44
<i>Праймер $(CTC)_6C$</i>	
3250–1550	50
1550–1000	19
1000–320	31

Использование в качестве праймера последовательности $(ACC)_6G$ позволило суммарно получить наибольшее количество ампликонов и наибольшую долю полиморфных локусов среди них (табл. 2). Праймер $(GAG)_6C$ суммарно у животных позволил выявить 17 локусов в спектрах продуктов амплификации, среди которых полиморфными оказалось только 47%. При использовании праймера $(AGC)_6G$ получен спектр ампликонов, среди которых оказалось наименьшее количество полиморфных локусов (25%) (табл. 2). При использовании в качестве праймера последовательности $(CTC)_6C$ суммарно обнаружено 16 ампликонов, однако по большинству из них (94%) наблюдался выраженный полиморфизм среди исследованной группы животных.

**Наличие полиморфных локусов в спектре ампликонов (ISSR-PCR метод),
полученных при использовании тринуклеотидных праймеров
у серой украинской породы крупного рогатого скота**

Праймер	Число исследованных животных, гол.	Количество ампликонов в спектре	Доля полиморфных ампликонов в спектре, %	PIC
(ACC) ₆ G	28	32	97 (31 ампликон)	0,280
(GAG) ₆ C	16	17	47 (8 ампликонов)	0,233
(AGC) ₆ G	6	16	25 (4 ампликона)	0,162
(CTC) ₆ C	21	16	94 (15 ампликонов)	0,300

П р и м е ч а н и е. Здесь и в табл. 3 PIC — полиморфное информационное содержание локуса.

Полученные данные свидетельствуют о том, что каждый используемый праймер в ISSR-PCR-методе приводил к формированию высоко специфичных спектров продуктов амплификации именно для данного праймера, как по количеству ампликонов, так и по доле полиморфных локусов. Их полиморфизм не был прямо связан с количеством выявляемых локусов и был наибольшим в спектрах ампликонов, выявленных с помощью праймеров (ACC)₆G и (CTC)₆C, по сравнению со спектрами, полученными при использовании праймеров (GAG)₆C и (AGC)₆G.

Обращают на себя внимание выраженные отличия спектров, полученных при использовании в качестве праймеров последовательностей (GAG)₆C и (CTC)₆C, принадлежащих к так называемым пурин/пиримидиновым трактам, способным формировать триплексные структуры, предположительно принимающие участие в регуляции генной экспрессии [9]. При наличии примерно одинакового количества ампликонов в спектрах (17 для (GAG)₆C и 16 для (CTC)₆C) они существенно отличались по доле полиморфных локусов, а также по представленности в спектрах ампликонов разной длины (см. табл.1, в спектре (GAG)₆C преобладали «легкие» ампликоны, в спектре (CTC)₆C — «тяжелые»). По-видимому, это может свидетельствовать об относительно повышенной консервативности у исследованных животных коротких фрагментов ДНК, фланки-

рованных инвертированным повтором (GAG)₆C, по сравнению с фрагментами, фланкированными повтором (CTC)₆C. Полученные данные свидетельствуют о существенных отличиях в распределении этих повторов по геномам исследованных животных серой украинской породы.

Выполнен расчет индекса PIC (polymorphism information contents) по формуле [10] для диаллельных локусов, для которых $PIC=2f(1-f)$, где f — частота одного из двух аллелей. Поскольку маркеры ISSR-PCR имеют доминантный характер наследования по присутствию продукта амплификации, f рассчитывали по частоте рецессивного аллеля исходя из доли носителей рецессивных гомозигот среди исследованных животных, соответственно по формуле VR , где R — количество носителей рецессивных гомозигот, деленное на количество исследованных животных.

Индекс PIC характеризует уровень гетерозиготности локусов — продуктов амплификации исходя из представлений о том, что по каждому локусу исследованная группа животных находится в равновесном состоянии, соответствующем закону Харди-Вайнберга. Полученные величины PIC для каждого локуса спектра усредняли по всем ампликонам спектров одного праймера у исследованных пород. Видно, что полученные данные качественно совпадают с результатами оценки доли полиморфных локусов: наи-

большие значения PIC обнаруживаются в спектрах праймеров $(ACC)_6G$ и $(CTC)_6C$ по сравнению с двумя другими праймерами (см. табл. 2).

Следует отметить, что анализ полилокусных спектров ампликонов ISSR-PCR позволяет наблюдать в ряде случаев их выраженные отличия у разных полов. Так, в исследованной группе животных серой украинской породы присутствовали четыре быка. Полученные у этих животных спектры ампликонов с праймером $(ACC)_6G$ существенно отличались от выявленных у коров (рис. 1) по присутствию шести локусов, по которым наблюдались отличия и между быками — ампликоны длиной 2950, 1500, 1050, 690 пар оснований (п.о.) выявлены только у одного из них. После исключения ампликонов быков из общего спектра, уменьшение количества локусов до 26 существенно не сказалось на оценке доли полиморфных локусов. Учитывая спектры быков, в суммарном спектре наблюдается 3,1% доли мо-

номорфных локусов, а исключая их — 3,8%.

По праймеру $(GAG)_6C$ полученные спектры быков не вносят таких существенных изменений в общий спектр и отличаются от спектра коров по одному локусу — наличием ампликона длиной в 2500 пар оснований (п.о.), но при его исключении увеличилась доля мономорфных локусов. Суммарно 52,9% локусов спектра мономорфны (см. табл. 2), а при исключении спектра быков — 62,5%.

Полученные данные наглядно свидетельствуют о специфичности полиморфизма и распределения по геному фрагментов ДНК, фланкированных инвертированными повторами тринуклеотидных микросателлитных локусов, отличающихся по коровым мотивам.

Спектры ампликонов, полученные с использованием в качестве праймеров последовательностей динуклеотидных микросателлитных локусов $(AG)_6C$ и $(GA)_6C$ оказались существенно менее полиморфными (табл.3; рис. 2, 3),

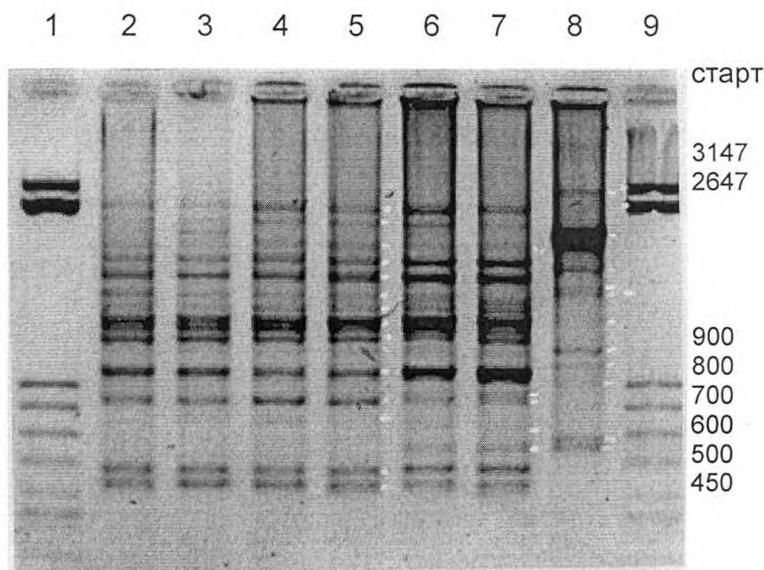


Рис. 1. Спектр ампликонов, полученный методом ISSR-PCR при использовании праймера $(ACC)_6G$: 1,9 — маркер молекулярных масс; 2-5 — серая украинская порода, коровы; 6-8 — серая украинская порода, быки

Наличие полиморфных локусов в спектре ампликонов (ISSR-PCR метод), полученных при использовании динуклеотидных праймеров у серой украинской породы крупного рогатого скота

Праймер	Число исследованных животных, гол.	Количество ампликонов в спектре	Доля полиморфных ампликонов в спектре, %	РІС
(GA) ₉ C	44	10	0	0
(AG) ₉ C	45	11	45 (5 ампликонов)	0,175

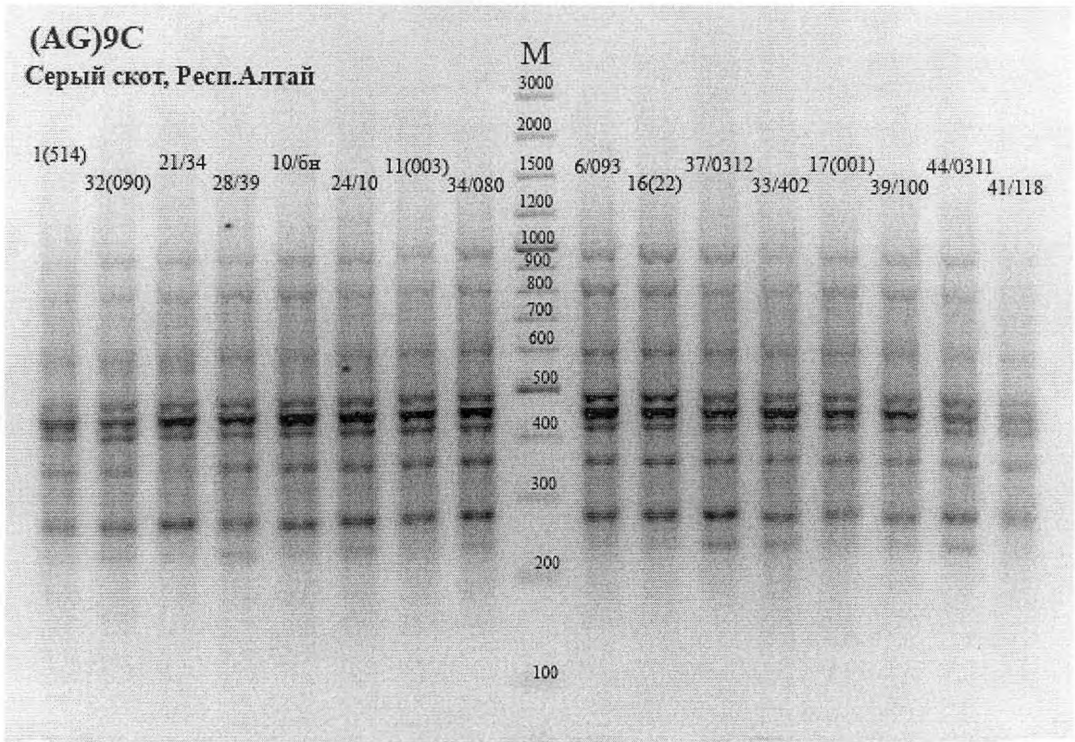


Рис. 2. Спектр ампликонов, получаемый методом ISSR-PCR при использовании праймера (AG)₉C. М — маркер молекулярных масс

чем фрагменты ДНК, фланкированные тринуклеотидными повторами (за исключением спектра праймера (AGC)₆G). У исследованных животных серой украинской породы не удалось обнаружить полиморфизма в спектрах ампликонов, выявляемых с праймером (GA)₉C.

В общем, использование в качестве праймеров в PCR фрагментов четырех тринуклеотидных и двух динуклеотид-

ных микросателлитных локусов позволило получить воспроизводимые и надежно выявляемые спектры продуктов амплификации. Среди выявленных 102 локусов в геномах животных серой украинской породы 58 (57%) оказались полиморфными. Усредненные по спектру каждого праймера значения полиморфного информационного содержания (PIC) по локусам спектра варьировали в пределах от 0 до 0,300. Полно-

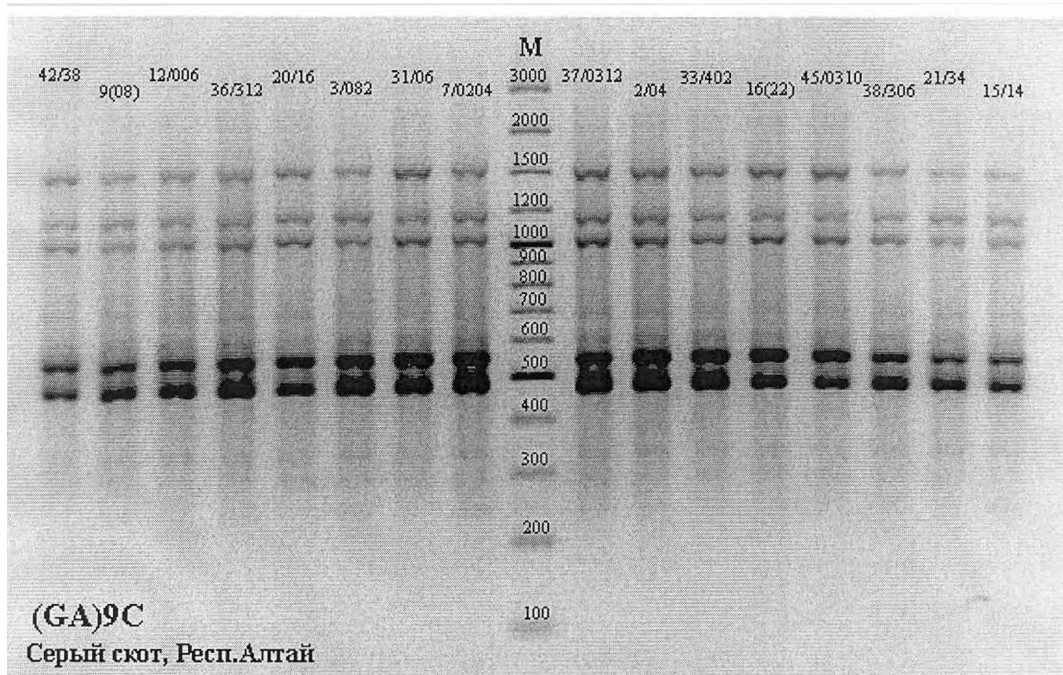


Рис. 3. Спектр ампликонов, получаемый методом ISSR-PCR при использовании праймера $(GA)_9C$. М — маркер молекулярных масс

стью консервативными оказались спектры ампликонов праймера $(GA)_9C$, наиболее изменчивыми — праймера $(ACC)_6G$. Более того, именно в спектре праймера $(ACC)_6G$ обнаруживаются отличия между коровами и быками серой украинской породы.

Полученные данные свидетельствуют о том, что наличие или отсутствие полиморфизма участков генома, фланкированных инвертированными повторами, определяется нуклеотидным мотивом фланга. Выраженные отличия в позиционировании инвертированных повторов в зависимости от таких мотивов, что проявляется в различиях между спектрами по количеству ампликонов, предпочтительностью их длины, а также в их полиморфизме у исследованных животных, свидетельствуют о неслучайности их геномного распределения. Возможность их принадлежности к структурно-функциональным участкам генома, отличаю-

щимся по своей консервативности, не позволяет использовать усредненные значения оценок их полиморфизма для суммарной характеристики генофонда серой украинской породы. Разработка такой характеристики, позволяющей судить о наличии «оптимума» [4, 5] гетерозиготности в генофонде вида, породы, популяции требует для каждого конкретного случая поиска геномных участков, полиморфизм которых наиболее объективно будет отражать динамические генофондные процессы. Простое усреднение оценок полиморфизма различных геномных участков, по-видимому, будет и далее способствовать получению противоречивых характеристик даже одних и тех же генофондов при включении в анализ разных наборов локусов. По результатам, полученным в наших исследованиях, очевидно, что у серой украинской породы контроль внутригрупповой изменчивости, близости

происхождения животных, реконструкцию их происхождения удобно выполнять с использованием высоко полиморфных спектров, полученных с использованием праймера (ACC)₆G и заметно отличающихся даже между животными разного пола. Чем обусловлены отличия в распределении инвертированных повторов микросателлитных локусов с разными коровыми мотивами, остается предметом дальнейших исследований.

Библиографический список

1. *Medyugorac I., Kustermann W., Lazar P et al.* Marker-derived phylogeny of European cattle supports demic expansion of agriculture // *Animal Genetics*, 1994. Vol.25. No.1. P. 19-27. — 2. *Glazko V.I., Diman T.N., Kushnir A.V.* Space and temporary subdivision of grey Ukrainian cattle genetic and phenetic structure. Intern. Conf. Budapest, 1998. P. 16-20. — 3. *Glazko V.I.* Podolic cattle in the Ukraine and eastern territories // *The origins of the hungarian grey cattle*. Budapest, 2000. P. 29-55. — 4. *Livshits G., Kobylansky E.* Lerner's concept of development homeostasis and the problem of heterozygosity level in natural populations // *Heredity*, 1985. Vol.55. P.341-353. — 5. *Leary R.F., Allendorf F.W., Knudsen K.L.* Differences in inbreeding coefficients do not explain the association between heterozygosity at allozyme loci and developmental stability in rainbow trout // *Evolution*, 1987. V. 41. № 6. P. 1413-415. — 6. *Dubrova Y.E., Plumb M., Brown J., Jeffreys A.J.* Radiation-induced germline instability at minisatellite loci // *Int. J. Radial Biol*, 1998. Vol.74, №6. P.689-696. — 7. *Toth G., Gaspari Z., Jurka J.* Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis // *Genome Research*, 2000. Vol.10. P.417-432. — 8. *Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D.* Genome fingerprinting by sequence repeat (SSR) — anchored polymerase chain reaction amplification // *Genomics*, 1994. 20. P.176-183. — 9. *Kalish J.M., Seidman M.M., Weeks D.L., Glazer P.M.* Triplex-induced recombination and repair in the pyrimidine motif // *Nucleic Acids Res*, 2005. Jun 16;33(II):3492-502.— 10. *Botstein D., White R.L., Scolnick M., Davis R.W.* Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism // *Am.J.Hum.Genet*, 1980. Vol.32. P.314-331.

Рецензент — д. б. н. Ю.А. Юлдашбаев

SYMMARY

The comparative analysis of polymorphism of 102 loci in genomes of Grey Ukrainian cattle revealed in polymerase chain reaction with the use as primers of fragments of four three nucleotide and two nucleotide microsatellite loci was carried out. The expressed differences of quantity of products of amplification, their lengths and polymorphism depending on core motive of the microsatellite fragment were found out. Completely conservative there were the spectra of amplification products of primer (GA)₉C, the most changeable — of primer (ACC)₆G. In the spectrum of primer (ACC)₆G the differences between cows and bulls of Grey Ukrainian breed were observed. Necessity of search of the genome sites which polymorphism estimations could serve as the objective characteristic of variability and consolidation in genofunds, and also their uniqueness, in investigated animal groups was discussed.