

М. В. Дыбков, Г. Д. Телегеев, М. Р. Столина, С. С. Малюта

ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ И СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЛИНИЙ МЫШЕЙ CC57W/Mv, C57Bl/6 И BALB/c МЕТОДОМ ГЕНОМНОЙ ДАКТИЛОСКОПИИ

Методом геномной дактилоскопии с зондом на основе фага M13 проведен анализ линий мышей BALB/c, C57Bl/6 и выведенной на их основе линии CC57W/Mv. Показано, что все три изученные линии представляют собой генетически однородные, четко дифференцированные друг от друга группы. Генетические дистанции между линиями составляют: для линий CC57W/Mv-C57Bl/6 — 0,144; CC57W/Mv-BALB/c — 0,182; C57Bl/6-BALB/c — 0,395.

Введение. После открытия в 1980-м г. гипервариабельных участков генома (ГУГ) [1] и появления первых работ по их изучению возникли новые перспективы для эффективного генетического маркирования организмов. Высокая гетерозиготность локусов, кодоминантный характер наследования, значительное количество и диспергированность в геноме — все это позволило использовать ГУГ в качестве высокоинформативных генетических маркеров. Помимо этого, геномные профили, т. е. картины, выявляемые при геномной дактилоскопии, характеризуются соматической и онтогенетической стабильностью, а также высокой индивидуальной специфичностью [2]. Открытие того факта, что зонды, содержащие последовательность гена III фага M13, выявляют гипервариабельные участки генома многих организмов, послужило новым стимулом для развития геномной дактилоскопии ввиду доступности данного зонда и его универсальности [3, 4].

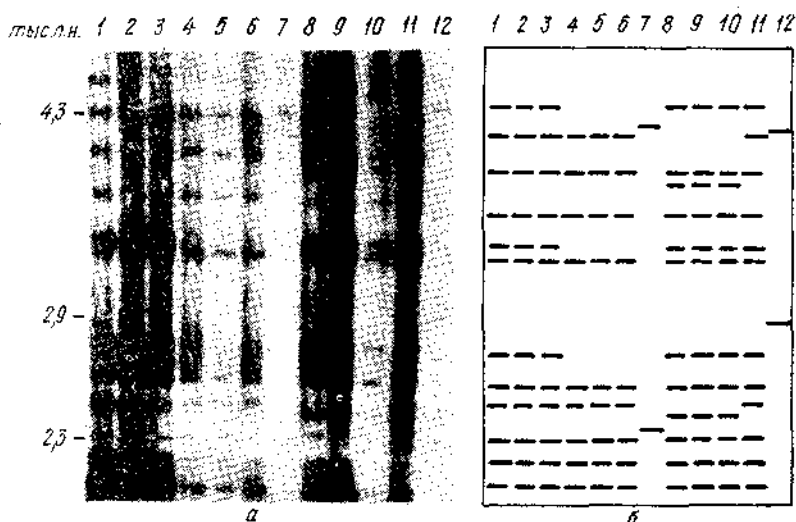
Одна из областей применения геномной дактилоскопии — проведение контроля и оценки генетической однородности изучаемых групп организмов и, в частности, линейных объектов. Показано, что при использовании геномной дактилоскопии значительно повышается эффективность инбредной селекции в сторону одного из родителей, т. е. этот метод позволяет снизить число возвратных скрещиваний, необходимых для достижения нужной степени гомозиготности [5]. Геномная дактилоскопия позволяет контролировать чистоту линий, которые поддерживаются в разных лабораториях, и предупреждать возможные ошибки при проведении экспериментов [6]. С помощью этого метода возможен анализ практически любых биологических объектов — животных, растений, клеточных линий и др. В настоящее время большое внимание уделяется созданию программ обработки и интерпретации геномных профилей и созданию на их основе баз данных с характеристическими описаниями эталонных линий, популяций, видов и т. п. На сегодняшний день накоплена обширная библиотека геномных профилей большого числа инбредных линий мышей и крыс [7].

В настоящей работе методом геномной дактилоскопии с зондом на основе фага M13 проанализированы линии BALB/c, C57Bl/6 и выведенная на их основе линия CC57W/Mv, поддерживаемые в Ин-те молекуляр. биологии и генетики НАН Украины, поскольку данные линии мышей предполагается использовать в модельной системе для изучения генетических и молекулярно-биологических эффектов хронического низкодозового облучения.

© М. В. Дыбков, Г. Д. Телегеев, М. Р. Столина, С. С. Малюта, 1995

Материалы и методы. Объекты исследования. Объектами исследования служили инбредные линии мышей BALB/c и C57Bl/6, а также выведенная на их основе линия CC57W/Mv, поддерживаемые в виварии ИМБИГ НАН Украины в течение более 20 поколений посредством братско-сестринских скрещиваний.

Выделение ДНК. Для анализа были взяты ткани хвоста мышей линий BALB/c, C57Bl/6 и CC57W/Mv. Образцы ткани замораживали и хранили до выделения ДНК. Ткани механически измельчали и



Геномный профиль мышей линии CC57W/Mv — 1—3, 11; C57Bl/6 — 4—6; BALB/c — 8—10 (a) и его схематическое представление. Маркеры молекулярной массы λ /HindIII (7) и M13/ClaI (12)

сuspендировали в лизирующем буфере с протенназой К (50 мМ трис-HCl, pH 8,0; 150 мМ NaCl; 10 мМ ЭДТА; 1 % DS-Na; 50 мкг/мл протенназы К), а затем инкубировали при 37 °С в течение ночи. После этого образцы подвергали фенол-хлороформной обработке [8] и после осаждения спиртом растворяли в ТЕ-буфере.

Рестрикция и фракционирование ДНК. По 10 мкг каждого образца ДНК обрабатывали рестриктазой *BspRI* в течение 4 ч. Рестрикты переосаждали с ацетатом аммония и растворяли в дистиллированной воде. Фракционирование осуществляли в 0,95 %-м агарозном геле в течение 36—48 ч при 1,5—2 В/см. После этого ДНК электрофоретически переносили на капроновые мембраны «Хийу Калур» (Таллинн) и фиксировали прогревом в вакууме в течение 2 ч при 80 °С.

Гибридизация. Зонд с высокой удельной активностью получали достройкой на однострочной форме фага M13 при помощи праймера, «отжигающегося» вблизи гена III. Гибридизацию осуществляли, как описано в [9]. После отмывки фильтры экспонировали в течение 3—14 сут с пленкой РМ-1 в кассетах с усиливающими экранами.

Результаты и обсуждение. На рисунке представлен один из геномных профилей трех вышеперечисленных линий. В изучаемой области 10—2 тыс. п. н. выявлено 12 маркерных полос для линии BALB/c, 9 маркерных полос для линии C57Bl/6 и 12 — для линии CC57W/Mv. При анализе гибридизационных картин не было выявлено каких-либо индивидуальных и половых отличий внутри каждой из линий мышей. При сравнительном анализе изучаемых линий обнаружено 7 маркерных полос, общих для всех трех линий мышей. Данные маркеры, вероятно, относятся к таковым, характеризующим ту или иную группу организмов. Наряду с ними отмечены и те полосы, которые позволяют провести четкую дифференциацию всех трех линий мышей относитель-

но друг друга. На рисунке показаны три маркерные полосы, общие для линий BALB/c и CC57W/Mv и отсутствующие у линии C57Bl/6, а также две маркерные полосы, общие для линий C57Bl/6 и CC57W/Mv и отсутствующие у линии BALB/c. Показательно, что три отличающиеся маркерные полосы прослеживаются в высокомолекулярной области геномного дактоотпечатка. Во многих работах [2, 10] указывается на то, что высокомолекулярные маркеры характеризуются более высоким уровнем гетерозиготности в популяции и различия, описанные по маркерам данной группы, наиболее достоверны. При попарном сравнении линий мышей были выявлены 9 общих маркерных полос для пары CC57W/Mv-C57Bl/6; 10 — для пары CC57W/Mv-BALB/c и 7 — для пары C57Bl/6-BALB/c. Схожесть линий оценивали по частоте совпадения маркерных полос (частоту находили по формуле $S = 2 \cdot n_1 / (n_1 + n_2)$, где $n_1, 2$ — число общих полос для двух объектов, n_1 и n_2 — общее число полос у объектов 1 и 2 соответственно). Данная величина равна: для пар BALB/c-CC57W/Mv — 0,83; C57Bl/6-CC57W/Mv — 0,86; BALB/c-C57Bl/6 — 0,67. Высокая частота совпадения маркерных полос родительских линий мышей BALB/c-C57Bl/6 (0,67) по сравнению с природными популяциями (по разным оценкам, 0,2—0,5), вероятно, вызвана инбридингом лабораторных животных. Оценка генетических расстояний между линиями проводили по Ней [11]. Они составили: между линиями мышей CC57W/Mv-C57Bl/6 — 0,144; CC57W/Mv-BALB/c — 0,182; C57Bl/6-BALB/c — 0,395. Как и ожидалось, генетические дистанции для пар родительская — дочерняя линии меньше, чем для родительской пары. Столь значительная дистанция между родительскими линиями объясняется тем, что данные линии были выведены из различных лабораторных стоков мышей [12] и подверглись сильному разнонаправленному искусственному отбору длительным инбридингом.

Из изложенного выше следует, что проанализированные линии являются высокооднородными, четко дифференцированными друг от друга генетическими группами. Полученные при геномной дактилоскопии характеристики позволяют осуществлять эффективный контроль состояния линий мышей в модельной системе.

М. В. Дибков, Г. Д. Телегеев, М. Р. Столина, С. С. Малыга

ВИВЧЕННЯ ГЕНЕТИЧНОЇ СТРУКТУРИ ТА ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ ЛІНІЙ МИШЕЙ CC57W/Mv, C57Bl/6 І BALB/c МЕТОДОМ ГЕНОМНОЇ ДАКТИЛОСКОПІЇ

Резюме

Методом геномної дактилоскопії з використанням зонду на основі фага M13 проаналізовано лінії мишей BALB/c, C57Bl/6 та виведену на їх основі лінію CC57W/Mv.

Показано, що всі три вивчені лінії мишей є генетично однорідними, чітко диференційованими одна від одної групами. Генетичні дистанції між лініями складають: для ліній CC57W/Mv-C57Bl/6 — 0,144; CC57W/Mv-BALB/c — 0,182; C57Bl/6-BALB/c — 0,395.

M. V. Dybkov, G. D. Teleguev, M. R. Stolina, S. S. Maluyuta

STUDY GENETIC STRUCTURE AND COMPARATIVE ANALYSIS MOUSE STRAINS CC57W/Mv, C57Bl/6, BALB/c USING METHOD DNA FINGERPRINTING

Summary

Using the method DNA fingerprints with phage DNA as a probe were made analysis mouse strains BALB/c, C57Bl/6, the progenitors of CC57W/Mv inbred mouse strain.

It was show that everyone mouse strain are genetics homogeneous and differentiation each from other groups. Genetic distance between mouse strains are 0.144 for strains CC57W/Mv-C57Bl/6; 0.182 for strains CC57W/Mv-BALB/c and 0.395 for strains C57Bl/6-BALB/c.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Wyman A., White R.* A highly polymorphic locus in human DNA // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1980.—77.—P. 6754—6758.
2. *Jeffreys A. J., Wilson V., Wong Z. et al.* Highly variable minisatellites and DNA fingerprints // *Biochem. Soc. Symp.*—1988.—53.—P. 165—180.
3. *Рысков А. П., Джинчарадзе А. Г., Просняк М. И. и др.* Геномная «дактилоскопия» организмов различных таксономических групп: использование в качестве гибридной зонды ДНК фага M13 // *Генетика.*—1988.—24, № 2.—С. 227—238.
4. *Vassart G., Georges M., Monsier R. et al.* A sequence in M13 phage detects hyper-variable minisatellites in human and animal DNA // *Science.*—1987.—235, N 4789—P. 683—684.
5. *Hiller J., Scaap T., Haberfeld A. et al.* DNA fingerprints applied to gene introgression in breeding programs // *Genetics.*—1990.—124, N 3.—P. 783—789.
6. *Samani N. J., Swales J. P., Jeffreys A. J. et al.* DNA fingerprinting of spontaneously hypertensive and Wistar—Kyoto rats: implications for hypertension research // *J. Hypertens.*—1989.—7, N 10.—P. 809—816.
7. *Deeny A. A., McDonald B.* DNA fingerprinting — a step forward in genetic monitoring // *Lab. Anim.*—1992.—26, N 2.—P. 141.
8. *Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж.* Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование.—М.: Мир, 1984.—480 с.
9. *Westneat D. F., Noon W. A., Reeve H. K., Aquadro C. F.* Improved hybridization conditions for DNA «fingerprints» probed with M13 // *Nucl. Acids Res.*—1988.—16, N 9.—P. 4161.
10. *Jeffreys A. J., Morton D. B.* DNA fingerprints of dog and cats // *Anim. Gen.*—1987.—18, N 1.—P. 1—15.
11. *Nei M.* Molecular population genetics and evolution.—Amsterdam: North-Holland publ., 1975.—288 p.
12. *Малашенко А. М., Бландова З. К.* Генетическая коллекция мышей (основа создания криоэмбриотеки).—Пушкино, 1985.—48 с.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики
НАН Украины, Киев

Получено 19.07.94