

Анализ генофондов некоторых видов *Ungulata* с помощью метода полимеразной цепной реакции

Л. Б. Зеленая, В. И. Глазко

Институт агроэкологии и биотехнологии УААН
252143, Киев, ул. Метрологическая, 12

Проведен сравнительный анализ спектров продуктов амплификации UBC-85 и UBC-126 (RAPD-ПЦР) у 13 видов Ungulata парно- и непарнокопытных животных. Выявлены специфические черты спектров ампликонов, которые отличают виды Artiodactyla от видов Perissodactyla.

Введение. Для решения целого ряда теоретических и практических задач фундаментальной и частной генетики в последнее время широко используется комплекс методов МААР (multiple arbitrary amplicon profiling) для выявления высокополиморфных молекулярно-генетических маркеров анонимных последовательностей ДНК. К одному из них относится RAPD (random amplified polymorphic DNA)-ПЦР.

К настоящему времени опубликовано большое количество научных работ, в которых задачи общей и частной генетики различных видов решались с помощью RAPD-ПЦР [1].

При проведении RAPD-ПЦР в качестве праймера используют, как правило, случайные декануклеотиды. Образование каждого ампликона возможно только при наличии двух сайтов отжига прямой и инвертированной последовательности праймера в одной цепи ДНК (палиндромной структуры). Теоретически предполагается, что участки такой гомологии с любыми декануклеотидами распределены по геномам случайным образом, а спектр и количество ампликонов, в основном, определяются следующими факторами [2]:

1) сложностью генома, то есть у разных видов с одинаковой сложностью геномов, например у млекопитающих, количество ампликонов должно быть сходным, но много больше, чем, в частности, у грибов и бактерий;

2) количеством нуклеотидов G и C в праймере: чем их меньше, тем выше частота ошибок отжига

(из-за более «рыхлой» АТ-связи) и тем больше ампликонов;

3) условиями амплификации: чем большей длины ампликоны можно получить, тем выше суммарное количество ампликонов в спектре.

Таким образом, предполагается, что спектр продуктов амплификации при использовании одного и того же декануклеотида в качестве праймера в одинаковых условиях амплификации должен быть сходным у видов, в частности млекопитающих, по количеству и представленности ампликонов разных длин. Отличия могут появляться только при использовании декануклеотидов, отличающихся по C- и G-содержанию. Секвенирование ряда ампликонов с последующим выяснением их гомологии с различными последовательностями геномной ДНК показало, что они представлены участками высокоповторенной, умеренноповторенной ДНК, а также входят в состав структурных генов [3, 4]. Эти данные свидетельствуют в пользу предположения о случайном распределении сайтов гомологии к декануклеотидам по длине генома. Однако до сих пор этот вопрос остается недостаточно исследованным.

В этой связи в настоящей работе выполнен сравнительный анализ спектров ампликонов у представителей двух отрядов млекопитающих — парно- и непарнокопытных (сходных по своей сложности) с использованием в качестве праймеров двух декануклеотидов, отличающихся по содержанию C- и G-нуклеотидов (UBC-85 — 70 % GC, UBC-126 — 50 % GC). Обнаружено, что спектры ампликонов имеют свои особенности, связанные как с используемым праймером, так и с преоблада-

нием ампликонов определенной длины, т. е. заметно отличаются от предполагаемых случайных вариантов.

Материалы и методы. Исследования выполнены на следующих видах животных, воспроизводящихся в условиях Биосферного заповедника «Аскания-Нова»:

ARTIODACTYLE Antilopinae — 1) *Saiga tatarica* (сайгак), $n = 2$; 2) *Taurotragus oryx* (канна), $n = 3$; 3) *Boselaphus tragocamelus* (нильгау), $n = 3$; 4) *Connochaetes gnu* (гну), $n = 2$; **Bovinae** — 5) *Bos taurus* (крупный рогатый скот), $n = 10$; 6) *Bison bison* (бизон), $n = 2$; 7) *Bison bonasus* (зубр), $n = 2$; 8) *Bibos gaurus frontalis* (гаял), $n = 2$.

PERISSODACTYLA Equidae — 9) *Equus przewalskii* (лошадь Пржевальского), $n = 20$; 10) *Equus caballus* (Арабская порода), $n = 20$; 11) *Equus asinus* (осел), $n = 2$; 12) *Equus hemionus hemionus* (кулан), $n = 3$; 13) *Equus (Dolichohippus) grevyi* (зебра Гриви), $n = 2$.

RAPD-ПЦР выполняли с использованием двух праймеров, первичная последовательность которых подобрана Бейли и Леар [5]. Авторы выбрали эти праймеры (UBC-85, UBC-126) из 212 как наиболее эффективные для межвидовых и внутривидовых исследований представителей видов *Equidae*.

Ядерную ДНК выделяли из 100 мкл цельной крови по стандартной методике. Для ПЦР-амплификации использовали праймеры UBC-85: 5'-GTGCTCGTGC-3' и UBC-126: 5'-CTTTCGTGCT-3'.

ПЦР-амплификацию осуществляли в следующем режиме: 5 циклов — 1 мин при 92 °C; 1 мин при 35 °C; 2,5 мин при 72 °C; 35 циклов — 1 мин при 92 °C; 1 мин при 42 °C; 2,5 мин при 72 °C. Всего 40 циклов.

Праймеры синтезированы фосфорамидитным методом на синтезаторе Gene Assembler Plus («Pharmacia», Швеция). Смесь для ПЦР содержала 15 пкмоль каждого праймера, по 100 мкмоль каждого dATP, dCTP, dGTP, dTTP. ПЦР-буфер: 670 мМ трис-HCl, 160 мМ сульфат аммония, 0,1 %-й Твин-20, хлорид магния в концентрации 2 мМ. В работе использовали термостабильную полимеразу *Thermus aquaticus* («Бион», Россия). В связи со спецификой проведения RAPD-анализа [6] концентрация препарата ДНК в ПЦР-смеси варьировала от 5 до 50 нг/мкл. ПЦР проводили в объеме 25 мкл в амплификаторе PTC-100 MJ Research, Inc. (США).

Продукты амплификации идентифицировали методом электрофореза в 1,5 %-м агарозном геле с последующей окраской бромистым этидием и визуализацией в УФ свете. Для определения размеров

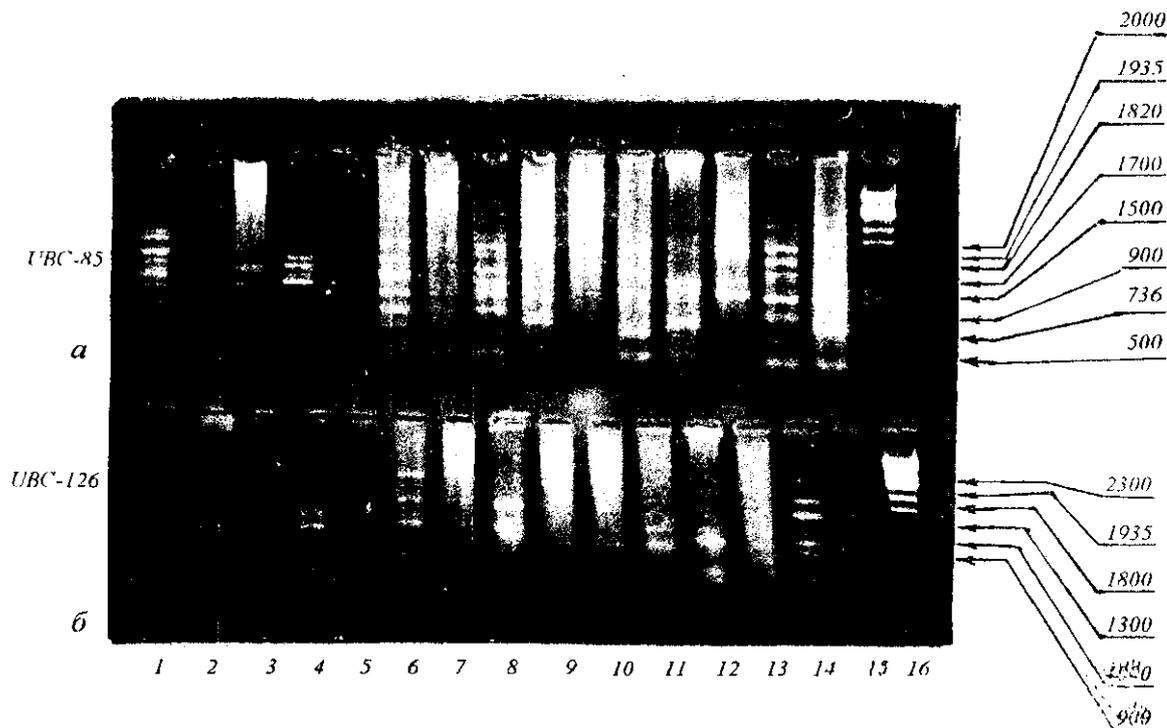
продуктов амплификации в качестве маркеров использовали: ДНК фага T7, рестрицированная эндонуклеазой *VspI*, и ДНК *pUC19*, рестрицированная *Sau3A*, *AluI*, *TaqI*.

С учетом имеющихся данных о возможности появления определенных проблем в воспроизводстве спектров ампликонов при RAPD-ПЦР [1, 6] в работе рассматривали только те продукты амплификации, которые воспроизводились в трех—пяти независимо повторенных процедурах ПЦР с геномной ДНК одних и тех же животных.

Результаты и обсуждение. При использовании UBC-85 суммарно обнаруживали 18 зон (от 2400 до 400 п. н., рисунок, а). Наибольшее количество продуктов амплификации (13) выявлено у представителей крупного рогатого скота (КРС), наименьшее (7) — у ослов, зубров и антилоп нильгау; у арабских лошадей, зебр Гриви и сайгаков наблюдали 8 зон, у лошадей Пржевальского, куланов, гаялов и антилоп гну — 9, у бизона и антилопы канна — 10. Чаще всего по этому маркеру обнаруживаются продукты амплификации размером 1935 (отсутствуют только у антилопы гну и сайгака), 1500 (отмечены у большинства исследованных видов, кроме лошади Пржевальского и зубра) и 1700 п. н. (отсутствуют у лошади Пржевальского, осла, сайгака и бизона). Продукты амплификации длиной 600 и 400 п. н. отсутствуют почти у всех исследованных видов, кроме КРС и бизона (400 п. н.), а также нильгау и зубра (600 п. н.).

Отдельно были проанализированы спектры продуктов амплификации UBC-85, полученные у непарно- и парнокопытных животных. Из 18 суммарных зон у представителей отряда непарнокопытных наблюдали 15 (отсутствуют фрагменты длиной 800, 600 и 400 п. н.). Среди исследованных пяти видов общими являются продукты амплификации длиной 1935 и 736 п. н.; фрагмент 1750 п. н. встречается только у осла, 1600 п. н. — у лошади Пржевальского, а 1100 п. н. — у кулана. Продукт амплификации размером 500 п. н. выявлен только у домашней лошади и лошади Пржевальского, а у остальных видов отсутствует. У животных отряда парнокопытные представлены все 18 зон. Для исследованных восьми видов общих зон не обнаружено: как правило, каждая из 18 зон встречалась у 1—7 видов. Наиболее часто встречался продукт амплификации размером 1500 п. н., отсутствующий только у зубра, а фрагмент длиной 900 п. н. отсутствует у всех проанализированных парнокопытных животных, кроме гаяла.

Таким образом, каждый ампликон в спектре продуктов амплификации UBC-85 у представителей двух отрядов млекопитающих встречается с



Спектр продуктов амплификации UBC-85 и UBC-126 (KAPD-PCR) у разных видов *Artiodactyla* и *Perissodactyla*: 1, 2 — *Equus hemionus hemionus*; 3, 4 — *Equus przewalskii*; 6 — *Equus caballus*; 7, 8 — *Bibos gaurus frontalis*; 9, 10 — *Saiga tatarica*; 11 — *Taurotragus oryx*; 12 — *Connochaetes gnu*; 13 — *Bison bonasus*; 14, 15 — *Bos taurus*; 16 — маркер молекулярных масс T7 + VspI

разной частотой. Так, фрагменты размером 1700 и 1800 п. н. представлены у 92 % исследованных видов животных, а ампликоны длиной 400 и 600 п. н. — у 15 %.

При использовании UBC-126 суммарно были выявлены 10 зон (2300—500 п. н., рисунок, б), из них у непарнокопытных — 9. Наименьшее количество продуктов амплификации (2) обнаружено у бизона, наибольшее (9) — у канны. У представителей видов сайгака и антилопы нильгау наблюдали 3 зоны, у кулана и антилопы гну — 4, у арабских лошадей и лошадей Пржевальского — 6, у осла, зебры Гриви, гаяла и КРС — 7, а у зубра — 8. Продукты амплификации размером 1400, 1300 и 900 п. н. встречаются у большинства исследованных видов, кроме бизона и антилопы нильгау (1300 и 900 п. н.), а также бизона, кулана и арабских лошадей (1400 п. н.). Наиболее редко выявляется продукт амплификации длиной 500 п. н., который наблюдается только у КРС и антилопы канны.

Сравнительный анализ спектров продуктов амплификации UBC-126 внутри каждого отряда позволил получить следующие данные. Из выявленных 10 суммарных зон у представителей отряда непарнокопытных обнаружены 9 (отсутствует фрагмент длиной 500 п. н.); общими для всех исследованных непарнокопытных животных являются продукты амплификации размером 1300 и 900 п. н., с высокой частотой встречаются зоны 1935 и 1800 п. н., отсутствующие только у зебры Гриви. У животных отряда парнокопытных наблюдались все 10 зон, каждая зона была представлена у 2—7 видов. Продукт длиной 1400 п. н. выявлялся у большинства исследованных парнокопытных, кроме бизона, а длиной 500 п. н. — только у антилопы канны и КРС. Следует также отметить, что среди четырех видов семейства *Bovinae* у двух (зубра и бизона) присутствуют фрагменты размером 2300 и 1935 п. н., а у двух других (КРС и гаяла) — отсутствуют.

Ампликоны длиной 900, 1300 и 1935 п. н. обнаружены у 85 % исследованных парно- и непарнокопытных видов животных, а размером 500 п. н. — только у 15 %.

Исследованные виды непарнокопытных отличались от парнокопытных отсутствием в спектрах ампликонов фрагментов размером 800, 600, 400 п. н. (UBC-85) и 500 п. н. (UBC-126), а также наличием в спектрах непарнокопытных зоны 736 п. н. (UBC-85), встречающейся у парнокопытных только у трех из восьми исследованных видов. В то же время продукт амплификации UBC-126 длиной 1400 п. н. у представителей отряда парнокопытных выявляется чаще, чем у непарнокопытных. Общей отличительной чертой для видов парнокопытных являлась повышенная частота встречаемости в спектрах продуктов амплификации ампликонов с относительно короткой длиной (400—800 п. н.) по обоим маркерам (за исключением ампликона длиной 736 п. н. по маркеру UBC-85), ампликоны такой длины встречались у 11 % исследованных видов непарнокопытных и у 33 % видов парнокопытных, причем встречаемость ампликонов относительно большей длины (900—2400 п. н.) оказалась у видов обоих отрядов практически одинаковой (у 59 % видов непарнокопытных и 58 % видов парнокопытных). Следовательно, для сравнительного анализа спектров ампликонов UBC-85 и UBC-126 видов этих двух отрядов наиболее информативными оказываются фрагменты с относительно низкой длиной, а для сравнения видов внутри отрядов — относительно длинные ампликоны (как наиболее полиморфные).

Таким образом, частота встречаемости продуктов амплификации определенной длины имеет свою специфику у исследованных видов и зависит от праймера — UBC-85 или UBC-126. Имеются ампликоны, сочетание которых «типично» для представителей видов каждого отряда. Суммарное количество ампликонов по всем видам заметно меньше для праймера UBC-126 (CG—50 %), чем для UBC-85 (CG—70 %), что не соответствует предположению об увеличении количества ампликонов при увеличении доли АТ-нуклеотидов [2]. То есть полученные экспериментально данные противоречат предположению о случайности распределения палиндромных структур, образуемых этими

декануклеотидами, и позволяют предположить отличия в темпах эволюции ампликонов разной длины у видов рассмотренных отрядов. Возможные механизмы таких отличий являются предметом дальнейших исследований.

Авторы выражают искреннюю благодарность сотруднику Института молекулярной биологии и генетики НАН Украины В. В. Дмитренко за плодотворное обсуждение материалов статьи.

Л. Б. Зелена, В. І. Глазко

Аналіз генофондів деяких видів *Ungulata* за допомогою методу полімеразної ланцюгової реакції

Резюме

Здійснено порівняльний аналіз спектрів продуктів ампліфікації UBC-85 та UBC-126 (RAPD-IIIЦР) у 13 видів парно- та непарнокопитних тварин. Виявлено специфічні риси спектрів ампліконів, які відрізняють види *Artiodactyla* від видів *Perissodactyla*.

L. B. Zelenaja, V. I. Glazko

RAPD-PCR for gene pool analysis of some *Ungulata* species

Summary

The comparative analysis of amplicon spectrums of UBC-85 and UBC-126 (RAPD-PCR) in 13 *Artiodactyle* and *Perissodactyla* species was carried out. The specific traits of amplicon spectrums, which distinguishing the species of *Artiodactyle* from *Perissodactyla* ones were revealed.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Caetano-Anolles G. Scanning of nucleic acids by *in vitro* amplification: New developments and applications // *Nature Biotechnol.*—1996.—14.—P. 1668—1674.
2. Caetano-Anolles G. MAAP: a versatile and universal tool for genome analysis // *Plant Mol. Biol.*—1994.—25.—P. 1011—1026.
3. Williams J. G. K., Kubelic A. R., Livak K. J. et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers // *Nucl. Acids Res.*—1990.—18.—P. 6531—6535.
4. Kostia S., Palo J., Varvio S.-L. DNA sequences of RAPD fragments in *Artiodactyls* // *Genome.*—1996.—39.—P. 456—458.
5. Bailey E., Leur T. Comparison of Thoroughbred and Arabian horses using RAPD markers // *Animal Genet.*—1994.—25, Sup 1.—P. 105—108.
6. Demeke T., Laroche A., Gaudet D.A. A DNA marker for the Bt-10 common bunt resistance gene in wheat // *Genome.*—1996.—39, N 1.—P. 51—55.

Поступила в редакцию 07.05.97