

## **БЫСТРЫЙ И ЭФФЕКТИВНЫЙ СПОСОБ ИДЕНТИФИКАЦИИ МИКРОСАТЕЛЛИТНОЙ ДНК У МАЛОИССЛЕДОВАННЫХ ВИДОВ ЖИВОТНЫХ НА ПРИМЕРЕ СЕМИРЕЧЕНСКОГО ЛЯГУШКОЗУБА**

**И.А. Ахметоллаев, Г.А. Исмагулова, Н.А. Айтхожина**  
*РГП «Институт молекулярной биологии и биохимии  
им. М.А. Айтхожина»*

Современные методы обнаружения и изучения гипервариабельных микросателлитов внесли большой вклад в молекулярно-генетические исследования многих видов животных. Мини- и микросателлитные маркерные системы являются наиболее информативными и эффективно применяемыми в популяционной и эволюционной биологии, геномном картировании и определении родства между видами и популяциями [1, 2, 3]. Для амплификации фрагментов ДНК, содержащих микросателлиты, необходима информация о первичной структуре ДНК, фланкирующих последовательность с повторяющимися элементами. Последовательности, фланкирующие микросателлитные локусы, различаются у разных геномов и для многих видов амфибий, рыб, рептилий, птиц и млекопитающих созданы маркерные системы, позволяющие идентифицировать аллельный полиморфизм. Однако у большинства организмов интересных с точки зрения геномной эволюции микросателлитные последовательности до сих пор не выявлены [4, 5, 6, 7].

Классические методы получения микросателлитных фрагментов основаны на клонировании маленьких фрагментов генома с дальнейшим применением радиоактивно-меченых олигонуклеотидов микросателлитных повторов для дискриминации клонов, содержащих обширные микросателлитные участки [8, 9, 10]. К сожалению, данный метод не позволяет идентифицировать микросателлиты с меньшим количеством повторов.

В связи с этим были разработаны 2 стратегии исследования микросателлитов. Первый способ основан это селекция по урацил-содержащим ДНК [11]. Второй способ - наиболее часто используемая стратегия захвата гибридизацией фрагментов, содержащих микросателлитные [12, 13, 14]. Второй подход позволяет произвести отбор по комплементарности последовательности микросателлита перед клонированием. Этот подход проще и быстрее при анализе нескольких образцов, тогда как селекция урацил-ДНК требует ведения каждой библиотеки в 2 бактериальных культурах.

В нашей работе мы модифицировали метод гибридизационного захвата, описанный Гамильтоном [15]. Отличительной особенностью

нашего протокола является то, что для вычитания фрагментов ДНК мы используем наиболее повторяемые микросателлитные участки, которые кроме того являются мишенью обогащения и выделения. Наша модификация линкера SuperSNX обеспечивает эффективное мечение каждого конца ПЦР-продукта для клонирования в вектор pENTR D/ТОРО в отличие от линкеров, использованных у Гамильтона [15].

**Материалы и методы.** Вычитание микросателлитной фрагментов проводили из ДНК, выделенной из хвостовых пластинок *Ranodon sibiricus*, с помощью набора для выделения ДНК из крови и тканей животных DNeasy® Blood & Tissue Kit по протоколу производителя (Qiagen). Качество ДНК определяли при помощи электрофореза в агарозном геле. Рестрикционную обработку препаратов ДНК проводили ферментами *RsaI* и *BstUI* и процедуры лигирования ДНК Т4-ДНК лигазой производили по протоколу производителя (Fermentas).

Микросателлитные зонды и праймеры синтезировали на ДНК-синтезаторе ASM-800 (Biosset, Новосибирск).

Для проведения поиска микросателлитов были подобраны нуклеотидные последовательности, содержащие ди-, три-, и тетрануклеотидные фрагменты. Модифицированные зонды получали добавлением на 5'-конец биотинилированного урацила с помощью терминальной трансферазы. Проверку эффективности модификации зондов проводили гибридизацией зондов с стрептоавидином на нитроцеллюлозной мембране.

Полимеразную цепную реакцию проводили в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 50мМ KCl, 20 мМ трис-HCl, pH 8.4, 3мМ MgCl<sub>2</sub>, 0.01% Tween-20, по 0.15 мМ каждого dNTP, 0.2 мкМ праймера, 20 нг матричной ДНК и 1 ед. Tag-полимеразы. Амплификацию проводили следующим образом: первые четыре цикла - 1 мин - 93 °С, 1.5 мин при 43°С и 2 мин при 72°С; в последующих циклах отжиг вели при 47-55°С. Проводили 35 циклов реакции. Последняя элонгация длилась 10 мин. Электрофоретическое разделение продуктов ПЦР осуществляли в 2%- ном агарозном геле и анализировали с помощью прибора Gel-Doc фирмы Bio-Rad в проходящем ультрафиолетовом свете при длине волны от 260 до 360 нм.

Клонирование вычитанных фрагментов ДНК проводили с помощью набора pENTR™ Directional TOPO® Cloning Kits по протоколу производителя. Клетки *E.coli* штамма 2XL трансформировали генетическими конструкциями для наработки плазмиды и после трансформации выращивали на среде LB-агар.

**Результаты и обсуждение.** Твердофазным фосфорамидитным способом были синтезированы фрагменты: Mix 2 в составе (AG)<sub>12</sub>, (TG)<sub>12</sub>, (AAC)<sub>6</sub>, (AAG)<sub>8</sub>, (AAT)<sub>12</sub>, (ACT)<sub>12</sub>, (ATC)<sub>8</sub>; Mix 3 - (AAAC)<sub>6</sub>, (AAAG)<sub>6</sub>, (AATC)<sub>6</sub>, (AATG)<sub>6</sub>, (ACAG)<sub>6</sub>, (ACCT)<sub>6</sub>; Mix 4 - (AAAT)<sub>8</sub>, (AACT)<sub>8</sub>, (AAGT)<sub>8</sub>, (ACTC)<sub>6</sub>, (ACTG)<sub>6</sub>. Для проведения вычитания микросателлитных фрагментов ДНК к

созданным зондам на 3'-конец добавлялся урацил-биотин. Биотин необходим для специфического взаимодействия с стрептоавидином, иммобилизованным на магнитных частицах. Важным условием нашей модификации является внесение в реакционную смесь дезоксиаденина для увеличения количества добавленного биотина.

Для проведения поиска микросателлитов, используемых в фингерпринтинге ДНК, необходимо провести вычитание фрагментов из общей массы ДНК одного организма. Для этого необходимо тотальную высокомолекулярную ДНК расщепить на короткие фрагменты размерами от 250 до 1000 пар оснований. Такие короткие фрагменты позволяют зондам комплементарно связываться с фрагментами ДНК, несущими микросателлиты, они удобны для дальнейшего секвенирования и определения наличия микросателлитов, а также для дизайна праймеров, комплементарных участкам фланкирующих микросателлиты.

На рисунке 1 представлены результаты электрофоретического разделения ДНК лягушкозуба, фрагментированной рестриктазой *RsaI*.

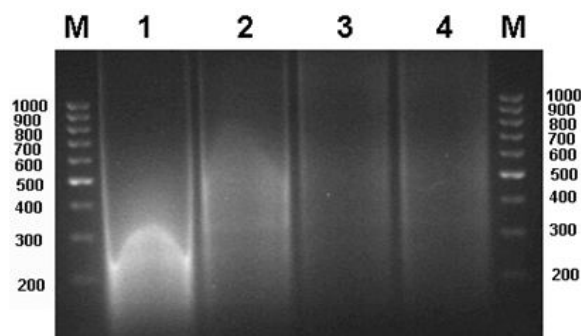


Рисунок 1 - Электрофоретическое разделение в 1.2% агарозном геле продуктов рестрикционного фрагментирования тотальной ДНК семиреченского лягушкозуба рестриктазой *RsaI*. 1-4 различные варианты образцов *R. sibiricus*. М – маркер молекулярных весов 100b.p.

Фрагменты ДНК распределяются в зоне движения молекул размером от 200 до 1000 пар оснований. Наилучшими условиями расщепления ДНК были: концентрация ДНК 100 нг/мкл; фермент *RsaI* – 5 ед на реакцию, объем реакционной смеси - 20 мкл. Рестриксию проводили при 37°C в течении ночи и реакцию останавливали прогревом смеси при 70°C в течении 10 минут.

Для получения препаратов фрагментированной ДНК и наработки их в количестве достаточным для вычитания микросателлитов к 5' и 3' концам фрагментированной ДНК пришивали линкеры представленные на рисунке 2.



Рисунок 2 - Нуклеотидная последовательность линкера для связывания с 5' и 3' концами фрагментированной ДНК

Линкер SuperSNX24+4P на 5' конце несет фосфатные группы, а на 3'-конце имеет четыре молекулы аденина. Благодаря такой структуре линкер связывается по обоим концам фрагментированной ДНК. Последовательность линкера становится сайтом связывания для олигонуклеотида SuperSNX24 в последующих шагах вычитания микросателлитов. В структуру линкера также входят последовательность облегчающая дальнейшее клонирование вычтенных фрагментов и сайты для рестриктаз, имеющихся в полилинкере вектора для клонирования. В составе SuperSNX имеется последовательность CACC, которая необходима для безлигазного клонирования в вектор pENTR D/TOPO.

Линкер добавляли с помощью T4-лигазы по протоколу фирмы-производителя. Определение степени связывания линкеров с фрагментированной ДНК осуществляли с помощью амплификации линкерной смеси праймером SuperSNX24. На рисунке 3 представлены результаты ПЦР фрагментированной ДНК с праймером SuperSNX24.

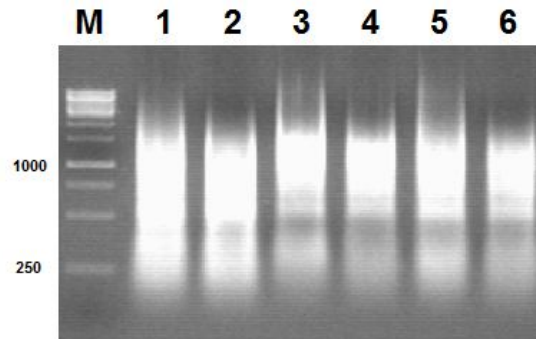


Рисунок 3 - Амплификация фрагментированной ДНК с добавленными линкерами с помощью праймера SuperSNX24. М – маркер молекулярных весов 1kb.

Наличие продуктов ПЦР говорит об эффективном присоединении линкера к ДНК-фрагментам. При проведении вычитания фрагментов, содержащих микросателлиты, использовали очищенные продукты ПЦР.

Для вычитания фрагментов ДНК, содержащих микросателлиты, к продуктам ПЦР добавляли биотинилированные зонды Mix2, Mix3 и Mix4. В первой стадии вычитания микросателлитов смесь ПЦР продуктов с зондами Mix2, Mix3 и Mix4 после их денатурации медленно ренатурировали и добавляли магнитные

частицы с иммобилизованным стрептоавидином. Вычитание гибридных молекул осуществляли в постоянном магнитном поле. С магнитных частиц связавшиеся фрагменты ДНК отделяли, подогревая их в течении 5 минут при 95°C. Эффективность вычитания оценивали добавляя полученную надосадочную жидкость в реакционную среду для проведения ПЦР с праймером SuperSNX24. Результаты амплификации представлены на рисунке 4.

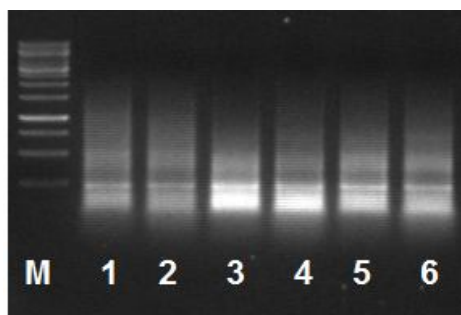


Рисунок 4 - ПЦР для определения эффективности вычитания с использованием магнитных частиц

Индивидуальные клоны, содержащие по одному фрагменту из смеси фрагментированной на короткие участки ДНК, получали лигированием ПЦР ампликонов с Т-вектором, сконструированном на основе рСК. После лигирования и трансформации компетентные клетки штамма XL2 высевали на питательную среду LB-агар с селективным агентом ампициллином, который позволял получить индивидуальные клоны, содержащие вставку.

Скрининг колоний, проявившихся на чашках Петри с LB-агаром, на наличие вставки проводили ПЦР с праймеров к M13. На рисунке 5 представлены результаты ПЦР скрининга колоний, полученных после трансформации.

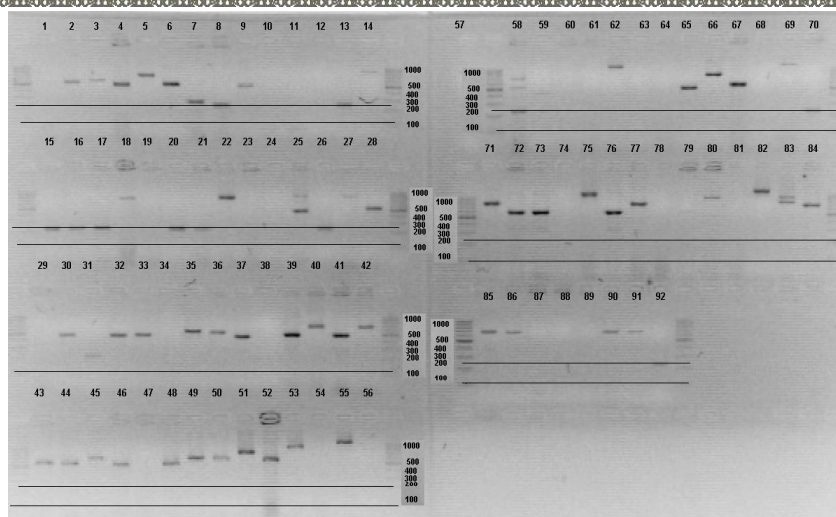


Рисунок 5 - Результаты скрининга колоний после трансформации T-вектором, содержащим вычтенные фрагменты ДНК. 1-92 клоны, взятые для скрининга. Маркер молекулярных весов 100b.p.

В результате скрининга были идентифицированы клоны, в которых присутствует фрагмент больше 200 пар оснований. Это означает, что между сайтами для связывания праймеров M13 имеется фрагмент ДНК, состоящий из вектора и фрагментированной ДНК. Как видно из результатов электрофоретического разделения, размер вставки варьирует от 300 до 1000 пар оснований.

Анализ первичной структуры полученных вставок изучали на сиквенаторе ALFexpressII с использованием праймеров к M13. Сиквенирование проводили по стандартному для этого прибора протоколу.

В результате сиквенирования были определены нуклеотидные последовательности, фланкирующие микросателлитные локусы, и синтезированы праймеры для амплификации фрагментов ДНК лягушкозуба, содержащих динуклотидные повторы.

Реакция ПЦР проходила в стандартных условиях с добавлением праймеров к локусу *Ran1*. Продукты амплификации анализировали на 6% полиакриамидном геле. Результаты генотипирования по локусу *Ran1* представлены на рисунке 6.

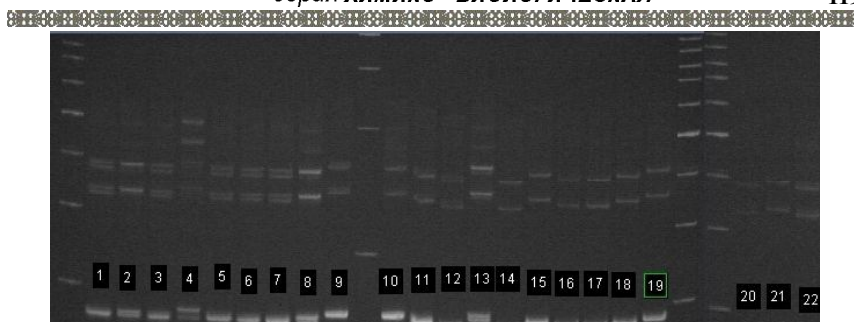


Рисунок 6 - Электрофоретическое разделение продуктов ПЦР генотипирования 28 образцов *R. sibiricus* по локусу *Ran1*

По полученным данным видно, что ампликоны идентифицированы у всех образцов ранодона. У образцов 2, 4, 8 и 13 идентифицированы по два аллеля, означающее, что эти образцы гетерозиготы и несут по два варианта одного локуса. Остальные образцы содержат по одному аллелю локуса *Ran1* и они, соответственно, гомозиготы. Интересным является факт наличия всего лишь 4 аллелей по этому локусу.

Наличие большого количества гомозигот и небольшой вариации аллелей по локусу *Ran1* подтверждает мнение зоологов предполагающих, что природные популяции семиреческого лягушкозуба возникли в результате горообразования в местах обитания лягушкозуба. В результате горообразования появился хребет Жетысуйское Алатау. В связи с тем, что *Ranodon sibiricus* ведет слабоподвижный образ жизни и не способен преодолевать большие преграды в виде гор и каменных насыпей, популяции географически изолированы друг от друга. Такая изоляция, исходя из других примеров эволюции видов, должна была привести и к генетической гетерогенности популяций. Полученные в нашем исследовании результаты анализ по локусу *Ran1* свидетельствуют о том, что исследованные популяции лягушкозуба в достаточной мере гомогенны и не имеют широкую норму реакции по данному локусу. Следовательно, геном лягушкозуба слабо мутирует и не рекомбинирует. Большое количество гомозигот говорит о постоянном близкородственном скрещивании и выделении «чистой линии». Однако для полного анализа популяций лягушкозуба и оценки эволюционной стабильности вида необходимы дальнейшие исследования других популяций ранодона, а также поиск новых полиморфных локусов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Goldstein D.B. and Pollock D.D. Launching microsatellites: a review of mutation processes and methods of phylogenetic inference.// Journal of Heredity. 1997. V.88. P.335-342.
2. Jeffreys A.J., Bois Ph., Buard J. et al. Spontaneous and induced minisatellite instability.// Electrophoresis. 1997. V. 18. P. 1501-1511.

3. Ellegren H. Microsatellite mutations in germline: implications for evolutionary inference. // *Trends in Genetic*. 2000. V. 16. P. 551-558.
4. Moore, S. S. Sargeant, L. L., King, T. J., Mattick, J. S., Georges, M. and Hetzel, J. S. (1991). The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species. *Genomics* **10**, 654-660.
5. Pepin, L., Amigues, Y., Lepingue, A., Berthier, J., Bensaid, A. and Vaiman, D. (1995). Sequence conservation of microsatellites between *Bos Taurus* (cattle), *Capra hircus* (goat) and related species. Examples of use in parentage testing and phylogeny analysis. *Heredity* **74**, 53-61.
6. Primmer, C. R., Moller, A. P. and Ellengren, H. (1996). A wide-range survey of cross species microsatellite amplifications in birds. *Mol Ecol* **5**, 365-378.
7. Zhu, Y., Queller, D. C. and Strassmann, J. E. (2000). A phylogenetic perspective on sequence evolution in microsatellite loci. *J Mol Evol* **50**, 324-338.
8. Tautz, D. (1989). Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res* **17**, 6463-6471.
9. Weber, J. L. and May, P. E. (1989). Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Human Genet* **44**, 388-396.
10. Weissenbach, J., Gyapay, G., Dib, C., Vignal, A., Morissette, J., Millasseau, P., Vaysseix, G. and Lathrop, M. (1992). A second-generation linkage map of the human genome. *Nature* **359**, 794-801.
11. Ostrander, E. A., Jong, P. M., Rine, J. and Duyk, G. (1992) Construction of small-insert genomic DNA libraries highly enriched for microsatellite repeat sequences. *Proc Nat Acad Sci, USA* **89**, 3419-3423.
12. Armour, J. A. L., Neumann, R., Gobert, S. and Jefferys, A. J. (1994). Isolation of human simple repeat loci by hybridization selection. *Human Mol Gen* **3**, 599-605.
13. Kandpal, R. P., Kandpal, G. and Weissman, S. M. (1994). Construction of libraries enriched for sequence repeats and jumping clones, and hybridization selection for region-specific markers. *Proc Nat Acad Sci, USA* **91**, 88-92.
14. Kijas, J. M. H., Fowler, J. C. S., Garbett, C. A. and Thomas, M. R. (1994). Enrichment of microsatellites from the citrus genome using biotinylated oligonucleotide sequences bound to streptavidin-coated magnetic particles. *Bio-Techniques* **16**, 656-662.
15. Hamilton, M. B., Pincus, E. L., DiFiore, A. and Fleischer, R. C. (1999). Universal linker and ligation procedures for construction of genomic DNA libraries enriched for microsatellites. *BioTechniques* **27**, 500-507.



**Түйіндеме**

Гипервариаболді микросателлитті ДНҚ фрагменттері популяция мен түрлер арасындағы туыстықты анықтау мен геномды картирлеуді, популяциялық және эволюциялық биологияны молекулярлы-генетикалық зерттеу барысында айтарлықтай үлес қосты.

Құрамында (AG)12, (TG)12, (AAC)6, (AAG)8, (AAT)12, (ACT)12, (ATC)8, (AAAC)6, (AAAAG)6, (AATC)6, (AATG)6, (ACAG)6, (ACCT)6, (ACTC)6 және (ACTG)6 микросателлиты бар ДНҚ фрагменттерін алуға, клондауға және алғашқы құрылысын анықтауға ат салыстық. Биотинилді зондармен стрептоавидин имобилизденген магнитті бөлшектер арқылы шегеру өткізілді. Секвенсирлеу барысында құрамында динуклеотидты қайталанулары бар *Ranodon sibiricus* ДНҚ фрагменттерін амплификациялау үшін *RanI* праймерлері синтезделді және фланктаушы микросателлиттер локустарының нуклеотидты реттіліктері анықталды.

**Resume**

*DNA hypervariable microsatellite regions typing has a crucial impact on molecular genetics in population and evolutionary biology, genotyping relationship determination of species and populations. We have had an effort to obtain, clone and characterize primary structure of the following DNA microsatellite loci (AG)12, (TG)12, (AAC)6, (AAG)8, (AAT)12, (ACT)12, (ATC)8, (AAAC)6, (AAAAG)6, (AATC)6, (AATG)6, (ACAG)6, (ACCT)6, (ACTC)6 and (ACTG)6. Exclusion was performed with biotinylated magnetic particles that contain immobilized streptavidin. Sequence results determined microsatellites' flanking regions and *RanI* primers synthesis. *RanI* primers were used to amplify *Ranodon sibiricus* DNA containing dinucleotide repeats.*

ӘОЖ 591.3

**КӨШІРІП ОТЫРҒЫЗҒАН СИЫР ҰРЫҚТАРЫНЫҢ  
ДАМУЫНА ЫҚПАЛ ЕТЕТІН КЕЙБІР ӘСЕРЛЕР****М. Аятханұлы**

С.Торайғыров атындағы Павлодар Мемлекеттік Университеті

**К. Лейдинг, Х-П. Ноонер**

Нойштатд Айш Мал ұрықтандыру бірлестігі, Германия

Қанымдаушыдан (донордан) алған ұрықты қабылдаушыда (реципиентте) дамытуды ұрық көшіріп отырғызу биотехнологиясы дейді. Алатын ұрықтың сапасы мен санына қанымдаушының тигізетін әсері жан-жақты