

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ГРЫЗУНОВ ИЗ ЗОНЫ ХВОСТОХРАНИЛИЩА КОШКАР-АТА

Шаметов А.К.¹, Кожакметова А.Н.¹, Бигалиев А.Б.¹, Бигалиева Р.К.¹, Бекманов Б.О.²

¹Казахский национальный университет имени Аль-Фараби, г. Алматы, Республики Казахстан, e-mail: aitkhazha@gmail.com;

²Институт общей генетики и цитологии РГП, КН МОН РК, г. Алматы, Республики Казахстан

Молекулярно-генетические исследования (рестрикционный анализ ДНК) показывают, что частичная деградация ДНК, обычно приводящая к размыванию картины рестрикции, в данном случае компенсируется большим числом доминирующих повторов в геномах эукариот. Результаты исследований показывают, что по амплифицированным аллелям во всех линиях нет особых отличий. В случае использования праймеров с определенной нуклеотидной последовательностью ОРА-02, (AG)9C были получены многополосные спектры фрагментов ДНК большой песчанки. Число фрагментов ДНК у индивидуальных особей варьировало от 3 до 9. В общей сложности у большой песчанки в популяции г. Актау было выделено 26 отчетливых фрагментов ДНК. По праймеру (AG)9C по сравнению с контрольной линией у объекта под № 1 определена аллель с размером 350 п.о. А с использованием праймера (GA)9C у объекта № 1 по сравнению с контролем обнаружена аллель с размером 750 п.о. У объекта № 2 обнаружено всего 3 аллеля. Эти результаты показывают, что с использованием таких маркеров можно характеризовать генетическую структуру популяции, а именно проявление полиморфизма в условиях антропогенного пресса.

Ключевые слова: грызуны, геном, ДНК, RAPD-ПЦР, ISSR-ПЦР, рестрикция, полиморфизм

MOLECULAR GENETIC STUDIES OF RODENTS FROM THE AREA OF THE TAILINGS KOSHKAR-ATA

Shametov A.K.¹, Kozhakhmetova A.N.¹, Bigaliev A.B.¹, Bigalieva R.K.¹, Bekmanov B.O.²

¹Kazakh state women pedagogical university, e-mail: aitkhazha@gmail.com;

²Al-Farabi kazakh national university

Molecular-genetic analysis (PCR-RFLP DNA analysis) show that the partial degradation of DNA usually leading to the erosion pattern of restriction, which in this case is compensated by the large number of dominant repeats in eukaryotic genomes. The results show that the amplified alleles in all lines no special differences. In the case of primers with a specific nucleotide sequence OPA-02, (AG)9C were obtained multiband spectra of DNA fragments large gerbils. The number of DNA fragments from individual animals ranged from 3 to 9. In total, the great gerbil in the population of Aktau was allocated 26 distinct DNA fragments. The primer (AG)9C compared to the control line of the object under № 1 identified allele with a size of 350 n.s. and by using the primer (GA)9C object № 1 versus control allele detected with size 750 n.s. Object № 2 is detected only 3 allele. These results show that using such markers to characterize the genetic structure of the population, namely the manifestation of polymorphism in the conditions of anthropogenic pressure.

Keywords : rodents, genomes, DNA, RAPD-PCR, ISSR-PCR, restriction, polymorphism.

Территория Мангистауского нефтегазового комплекса относится к экологически неблагоприятным регионам. Наиболее сложная экологическая обстановка сложилась вокруг хвостохранилища Кошкар-Ата, расположенного в 8 км восточнее побережья Каспийского моря вблизи г. Актау, в 5 км к северу от промзоны и занимающего всю площадь природной впадины «Кошкар-Ата». В последнее время из-за закрытия некоторых предприятий объем сточных вод, поступающих в озеро, резко сократился, и хвостохранилище обмелело. Радиоактивные отходы и другие токсичные промышленные выбросы разносятся ветром на близлежащие населенные пункты. Отсюда актуальность темы определяется: во-первых,

интенсивным загрязнением природной среды в зоне добычи, транспортировки и переработки минерального сырья (урана, нефти, газа), необходимостью ранней диагностики устойчивости генома природных популяций, подвергающихся давлению антропогенного пресса (радиации, химических факторов и др.) и учета, прогнозирования текущих и отдаленных (генетических) последствий влияния мутагенных факторов среды обитания; во-вторых, познанием механизмов мутагенеза факторов внешней среды как фундаментальных основ сохранения генофондов природных популяций для устойчивого развития экосистем, что является одной из первоочередных задач, стоящих перед учеными и специалистами данного региона.

Материалы и методики исследования

Экспериментальные животные (*Rhombomys opimus* — большая песчанка) 3–4-месячного возраста [2] отловлены с прилегающих к хвостохранилищу территорий, а в качестве контроля — из зоны Прибалхашья. Геномную ДНК из крови животных выделяли с помощью фенол-хлороформных методов. Количественную и качественную оценку выделенных ДНК проводили с помощью спектрофотометрического и электрофоретического анализа. Для спектрофотометрического анализа проводили измерение адсорбции водных растворов ДНК при трех длинах волн: 260 нм, 280 нм и 320 нм. Размер молекул ДНК, также как наличие примесей РНК, определяли методом электрофореза в 0,7%-ном агарозном геле после окрашивания бромистым этидием. Визуализацию ДНК, РНК проводили в ультрафиолетовом свете с использованием трансиллюминатора [1, 3, 4, 9].

Обработка ДНК ферментами. В работе использовали ферменты производства «Fermentas», Вильнюс, Литва. Расщепление ДНК проводили в рекомендуемых производителем буферах для рестрикции ДНК при оптимальных температурах в течение 16 ч. Рестрикцию проводили в 20 мкл реакционной смеси, в которую добавляли 5 мкл ДНК и 0,5 мкл фермента. Активности использованных ферментов: *AluI* — 10 ед/мкл, *EcoRI* — 10 ед/мкл, *BsuRI* — 10 ед/мкл.

Электрофорез. Для выявления фрагментов длиной от 40 до 2000 п.о. использовали электрофорез в 8%-ном полиакриламидном геле (на дорожку наносили 5 мкл обработанной ДНК) («Sigma», США). После проведения электрофореза ДНК визуализировали бромистым этидием и фотографировали в УФ-свете.

Образцы ДНК. Для экстракции геномной ДНК использовали комплект реагентов *QIAamp DNA Mini Kit* (Qiagen, USA). Количественную и качественную оценку выделенных ДНК проводили с помощью ДНК-фотометра (*Biofotometer Plus*, Eppendorf, Германия) и электрофоретического анализа. Для проведения амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб использовали ПЦР-смесь с *Taq*-полимеразой, *PCR MasterMix*

(*ThermoScientific, USA*). Амплификацию проводили в автоматическом режиме на программируемом амплификаторе *Mastercycler nexus Gradient (Eppendorf, Германия)* [7].

RAPD-PCR анализ. Полимеразную цепную реакцию проводили с десятичленными олигонуклеотидными праймерами, синтезированными в РГП «Институт общей генетики и цитологии» (Казахстан), на синтезаторе ASM-800 компании «Биоссет», Россия. Для минимизации ошибки реакцию оптимизировали путем подбора необходимых концентраций каждого компонента и приготовлением общей смеси для всей выборки.

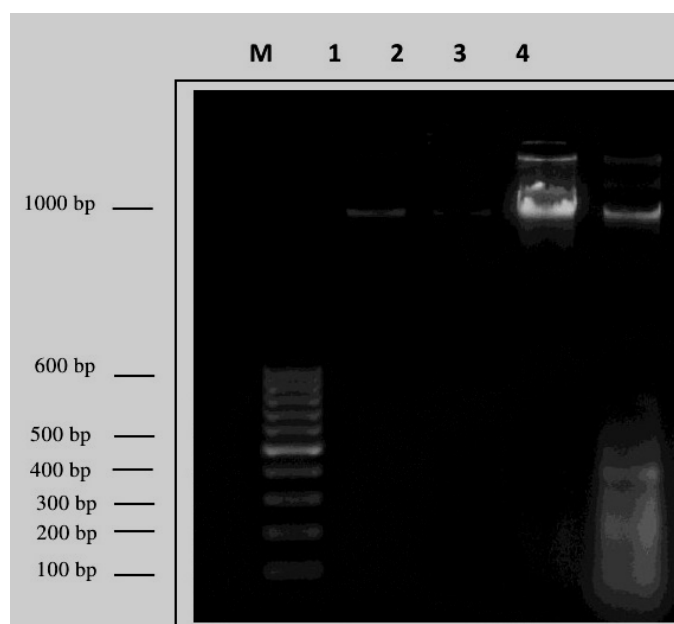
ISSR-PCR анализ. Реакцию проводили в 25 мкл смеси, содержащей 20 нг геномной ДНК, 100 мМ трис-*HCl* (pH=8.3), 500 мМ *KCl*, 4 мМ *MgCl*, 0.25 мМ *dNTP*, 0,5 мМ праймеры и 0,5 единиц *Taq* ДНК-полимеразы. Реакция проходила в следующих условиях: «горячий старт» — 2 мин/94°C, 40 циклов (денатурация — 30 с/94°C, отжиг праймера — 30 с/55°C, синтез — 2 мин/72°C), дополнительный синтез — 10 мин/72°C, охлаждение до 4°C.

Электрофорез. Электрофорез амплифицированных фрагментов ДНК проводили в 5%-ном полиакриламидном и 2%-ном агарозном геле в TAE_буфере (0,89 М Трис, 0,1 М ацетат натрия, 0,05 М ЭДТА), pH 7,8 с бромистым этидием (5 мкг/мл) и фотографировали в проходящем УФ-свете. Размер каждого фрагмента определяли путем сравнения с маркерными фрагментами ДНК *GeneRuller 100 kb DNA Ladder (ThermoScientific, USA)*.

Результаты исследования и обсуждение

Результаты рестрикционного анализа геномной ДНК мышей. Рестрикционный анализ ДНК любого организма широко используется в молекулярно-генетических исследованиях и является одним из наиболее важных инструментов при изучении эффектов загрязнителей на молекулярном уровне. Продукты расщепления молекулы ДНК анализируются с помощью гель-электрофореза в агарозном или полиакриламидном геле, а полученная таким образом картина разделения фрагментов молекулы ДНК в виде определенного, отличающегося для разных ферментов набора полос, и является результатом рестрикционного анализа исследуемой ДНК. Многие рестриктазы позволяют проводить расщепление ДНК по более чем 150 сайтам узнавания. Рестрикционный анализ проводится для самых различных ДНК, начиная от небольших фрагментов длиной несколько десятков нуклеотидных пар до целых геномов эукариот размерами более 1 млрд пар оснований.

Образцы ДНК. Нами первоначально проведены эксперименты по изучению картин рестрикции по расщеплению ДНК грызунов (*R. Opimus* — большая песчанка) эндонуклеазами с соответствующими сайтами узнавания. Для этого были выделены ДНК из клеток периферической крови (рис. 1).

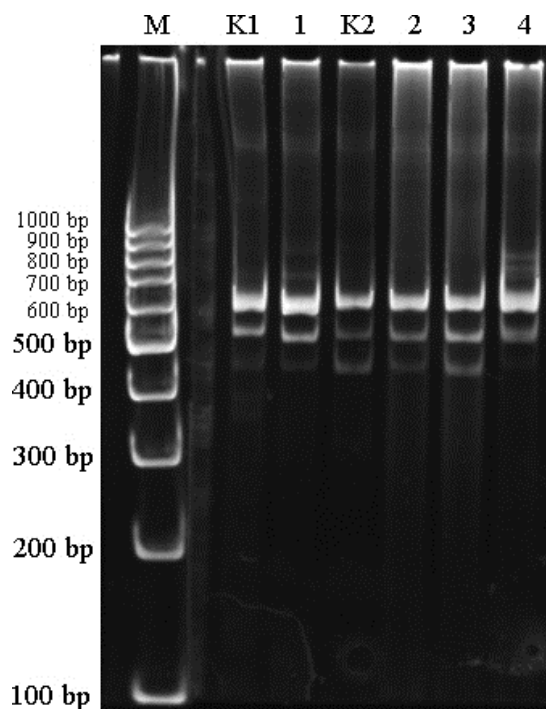


М – маркер GeneRuller 100 bp DNA Ladder («Fermentas», Вильнюс, Литва); 1-4 – образцы геномной ДНК

Рис. 1.- Электрофореграмма геномной ДНК грызуны (Rhombomys opimus-большая песчанка)

Известно, что очистка протяженной хромосомной ДНК больших размеров (в частности, ДНК эукариот) является сложной задачей из-за механического разрушения нитей молекул ДНК при использовании практически всех методик выделения. Тем не менее приведенные на рисунке 5 картины рестрикции показывают, что обычный фенол-хлороформный метод, с помощью которого были выделены все ДНК, вполне может быть использован для получения препаратов ДНК, пригодных для рестрикционного анализа *in vitro*. При этом частичная деградация ДНК, обычно приводящая к размыванию картины рестрикции, в данном случае компенсируется большим числом доминирующих повторов в геномах эукариот.

В 2014 г. повторно изучено влияние радиоактивного загрязнения на геномную ДНК мышевидных грызунов, отловленных из зоны исследования. На первом этапе исследований был использован праймер с нуклеотидной последовательностью ОРА-02 (5'-TGCCGAGCTG-3'). Далее был проведен анализ вариабельности случайно амплифицированной ДНК методом RAPD-PCR (рис. 2).

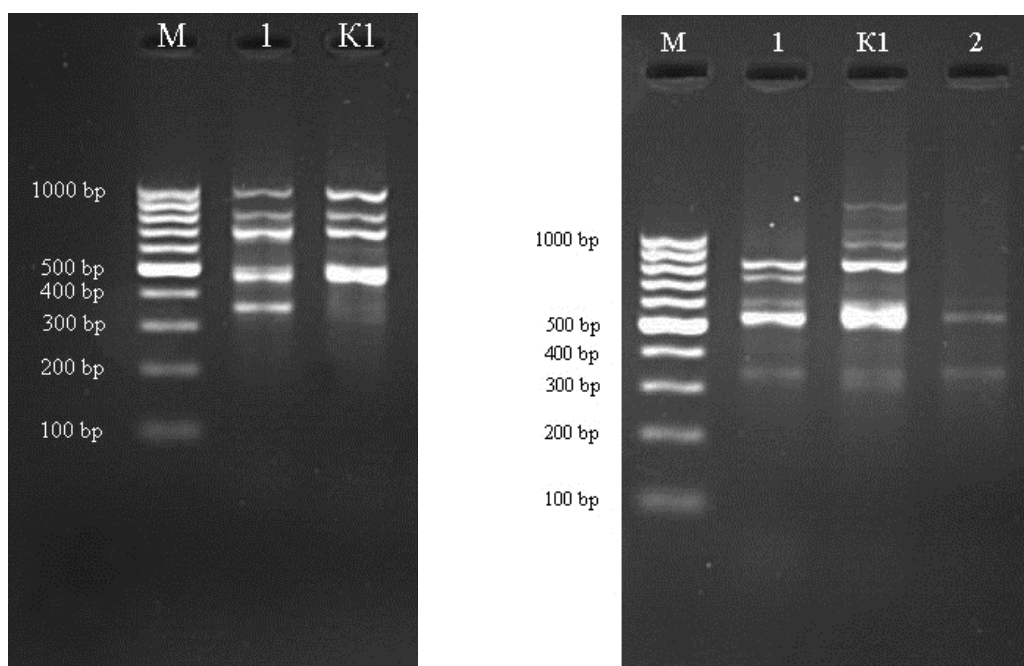


М – ДНК маркер (GeneRuller 100 kb DNA Ladder) маркер; 1–4 – контрольные линии. K1 и K2 — материалы из загрязненной территории

Рис. 2. RAPD-полиморфизм большой песчанки, выявленный с помощью праймера ОРА-02

RAPD-PCR — это ПЦР со случайной амплификацией полиморфной ДНК — используется для изучения изменчивости близких по генетической последовательности организмов, например разных сортов культурных растений, пород животных или близкородственных микроорганизмов. В этом методе обычно используют один праймер небольшого размера (около 10 п.н.). Этот праймер может оказаться частично комплементарным случайным участкам ДНК исследуемых организмов. На рисунке 6 видно, что по амплифицированным аллелям во всех линиях нет особых отличий. Это говорит о том, что праймеры данные с нуклеотидной последовательностью ОРА-02 менее информативны.

Далее было проведено ПЦР с помощью ISSR-маркеров. При проведении ISSR-анализа для полимеразной цепной реакции (ПЦР) в качестве праймеров использовали два олигонуклеотида, различающихся по нуклеотидному составу: (AG)₉C и (GA)₉C (рис. 3).



M – ДНК маркер (GeneRuller 100 kb DNA Ladder). K1 – линии, 1-2 – контроль.

Рис. 3. ISSR-спектр большой песчанки (Rhombomys opimus) полученный при амплификации ДНК с праймером (AG)9C и (GA)9C, соответственно

В результате с использованием этих праймеров были получены многополосные спектры фрагментов ДНК большой песчанки. Число фрагментов ДНК у индивидуальных особей варьировало от 3 до 9. В общей сложности у большой песчанки в популяции г. Актау было выделено 26 отчетливых фрагментов ДНК. По праймеру (AG)9C по сравнению из зоны Кошкар-Ата линии у объекта № 1 (вдоль трассы Актау — Аэропорт) появилась аллель с размером 350 п.о. А с использованием праймера (GA)9C у объекта № 1 по сравнению с объектом из территории Кошкар-Ата обнаружена аллель с размером 750 п.о. У объекта № 2 (70 км от г. Актау) обнаружено всего 3 аллеля. Эти результаты показывают, что с использованием таких маркеров можно характеризовать генетическую структуру популяции большой песчанки.

Подобные исследования были проведены и другими исследователями по исследованию молекулярных механизмов появления мутаций. Обобщены идеи гипотезы обмена, гипотезы «разрыв—соединение», данные о роли первичных повреждений ДНК и работы ферментов репарации [8]. В этих работах процесс появления структурных мутаций был рассмотрен как следствие первичного повреждения в молекуле ДНК и его превращения в разрыв хромосомы или хроматиды в результате работы ферментов репарации [5]. Для обоснования молекулярных основ структурного мутагенеза основополагающее значение имеет идея о потенциальных изменениях в ДНК. В свое время была высказана концепция,

что в хромосоме часть повреждений, индуцированных радиацией, возникает, по-видимому, не в форме разрыва, а в виде потенциальных повреждений. Н.П. Дубинин [4] разработал учение о потенциальных повреждениях в свете молекулярных механизмов образования хромосомных aberrаций. Это позволило ему создать новую концепцию о потенциальном повреждении, реализация которого в мутацию происходит через некоторое время при наличии определенных условий метаболизма в клетке. Полученные нами результаты по учету индуцированных хромосомных aberrаций в клетках костного мозга грызунов, подвергающихся воздействию радиационных факторов среды обитания, а также результаты рестрикционного анализа ДНК этих животных являются подтверждением потенциальных повреждений, а именно механизмов образования хромосомных мутаций.

Выводы. Многополосные спектры фрагментов ДНК большой песчанки получены методом рестрикционного анализа ДНК с использованием праймеров с определенной нуклеотидной последовательностью ОРА-02, (AG)₉C. Число фрагментов ДНК у индивидуальных особей варьировало от 3 до 9. Определены аллели с размером 350 п.о. и 750 п.о. Эти результаты показывают, что с использованием таких маркеров можно характеризовать генетическую структуру популяции, а именно проявление полиморфизма в условиях антропогенного пресса.

Список литературы

1. Алтухов Ю. П., Салменкова Е. А. Полиморфизм ДНК в популяционной генетике / Ю. П. Алтухов, Е. А. Салменкова // Генетика. — 2002. Т. 38, № 9. — С. 1173–1195.
2. Володин И.А., Ильченко О.Г., Попов С.В. Песчанки: содержание и демография популяций разных видов в неволе. — М., 1996. — 228 с.
3. Глазко В. И., Гладырь Е. А., Феофилов А. В. ISSR-PCR маркеры и мобильные генетические элементы в геномах сельскохозяйственных видов млекопитающих // Сельскохозяйственная биология. — 2013. — № 2. — С. 71–76.
4. Дубинин Н. П., Глембоцкий Я. Л., Кушнер Х. Ф. Генетические основы селекции животных — М.: Наука, 1969. — 448 с.
5. Дубинин Н. П., Пашин Ю. В. Мутагенез и окружающая среда. — М., 1978. — 128 с.
6. Зеленина Д. А., Хрусталева А. М., Волков А. А. Сравнительное исследование популяционной структуры и определение популяционной принадлежности нерки (*Oncorhynchus nerka*) Западной Камчатки с помощью RAPD-PCR и анализа полиморфизма микросателлитных локусов // Генетика. — 2006. — Т. 42. — С. 693–704.

7. Оберемок В. В. Методические рекомендации к применению ПЦР-метода. – Симферополь: ТНУ, 2008. – 34 с.5
8. Shi A., Kantartzi S., Mmbaga M., Chen P. Development of ISSR PCR markers for diversity study in dogwood (*Cornus spp.*) // Agriculture and biology journal of North America. – 2010. - № 1 (3). - P. 189-194.
9. Stolpovskii Yu. A., Lazebny O. E., Stolpovskii K. Y. The use of the ISSR-PCR method for identifying domesticated animal breeds and species, inferring their population structures, and assessing gene pool similarity // Russian Journal of Genetics. - 2010. - № 46. - P.732-739.

Рецензенты:

Заядан Б.К., д.б.н., профессор, декан факультета биологии и биотехнологии Казахского национального университета имени аль-Фараби, Министерства образования и науки РК, г.Алматы;

Канаев А.Т., д.б.н., профессор, заведующий кафедрой биоразнообразия и биоресурсов Казахского национального университета имени аль-Фараби, Министерства образования и науки РК, г.Алматы.