

УДК 636.1/.2:599.723:575.174.015.3:

ISSR-PCR МАРКЕРЫ И МОБИЛЬНЫЕ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЭЛЕМЕНТЫ В ГЕНОМАХ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ВИДОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ*

В.И. ГЛАЗКО¹, Е.А. ГЛАДЫРЬ², А.В. ФЕОФИЛОВ¹, Н.В. БАРДУКОВ¹, Т.Т. ГЛАЗКО¹

В целях геномного сканирования (полилокусного генотипирования) широко применяются высокополиморфные ISSR-PCR маркеры — фрагменты ДНК, фланкированные инвертированными повторами микросателлитов. Выполненное секвенирование таких фрагментов ДНК геномов домашней лошади и крупного рогатого скота свидетельствует о тесной связи между инвертированными повторами микросателлитов и продуктами рекомбинаций ретротранспозонов. Обсуждается взаимное геномное позиционирование микросателлитов и ретротранспозонов как источник полиморфизма ISSR-PCR маркеров.

Ключевые слова: микросателлиты, ретротранспозоны, эндогенные ретровирусы, ISSR-PCR маркеры.

Keywords: microsatellites, retrotransposons, endogenous retroviruses, ISSR-PCR markers.

Переход от генетики к геномике, от работы с отдельными генетическими элементами к сравнительному анализу целых геномов в нанометровом масштабе открывает новые возможности в изучении генетических структур и их динамики у разных групп живых организмов. Геномное сканирование приобретает особое значение в исследованиях генофондов сельскохозяйственных видов, поскольку только наличие достаточного количества геномных молекулярно-генетических маркеров позволяет сохранять, контролировать и совершенствовать необходимое биоразнообразие таких видов. Сканирование может проводиться как на уровне нескольких десятков или сотен маркеров, так и в объеме полного секвенирования геномов (1). В настоящее время разработано достаточно много методов подобного сканирования, к одному из них относится геномное полилокусное генотипирование по фрагментам ДНК разной длины, фланкированных инвертированным повтором микросателлитных локусов (inter-simple sequence repeats — ISSR-PCR маркеры) (2). Инвертированные повторы вызывают особый интерес, поскольку предрасположенность к формированию вторичных структур ДНК (шпилек, петель) составляет основу для геномной нестабильности в участках их локализации (3).

Одна из особенностей ISSR-PCR маркеров, как и других повторов, в частности SINE, заключается в их неравномерном распределении по геному (3, 4). Более того, ранее нами было обнаружено, что некоторые ISSR-PCR маркеры в геноме домашней лошади могут формироваться в результате рекомбинаций разных мобильных генетических элементов (5, 6).

Для того чтобы оценить связь ISSR-PCR маркеров с рекомбинациями между ретротранспозонами, в настоящей работе изучали наличие участков гомологии к нуклеотидным последовательностям, выявленным нами ранее у лошадей, в геномах крупного рогатого скота.

Методика. Исследования выполнены на геномной ДНК группы лошадей алтайской породы и крупного рогатого скота (6 гол. казахской белоголовой породы и 2 гол. якутской породы).

Для выделения геномной ДНК из цельной крови использовался

* Работа частично выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ, шифр 2012-1.4-12-000-1016-008.

набор реагентов ДНК-Экстран-1 (ЗАО «Синтол», г. Москва). PCR проводили на амплификаторе Терцик («ДНК-технологии», Россия), программа амплификации для образцов лошадиной ДНК включала первичную денатурацию (94 °С, 2 мин); 30 циклов денатурации (94 °С, 30 с), отжига праймера (62 °С, 30 с) и элонгации (72 °С, 2 мин); финальную элонгацию (72 °С, 10 мин). Для образцов ДНК крупного рогатого скота программа отличалась сниженной до 55 °С температурой отжига праймера и числом циклов, равным 35. Для постановки реакции применяли наборы ПЦР-РВ (ЗАО «Синтол», г. Москва) в соответствии с рекомендациями производителя. В качестве праймеров были выбраны последовательности: 5'-GAGA-GAGAGAGAGAGAGCCCATGG-3' (лидирующая) и 5'-GAGAGAGAGA-GAGAGCGAAAGAGC-3' (терминирующая). Электрофоретический анализ продуктов амплификации проводили с использованием 1,5 % агарозного геля в 1×TBE-буфере с добавлением бромистого этидия до конечной концентрации 0,5 мкг/мл при силе тока 100 мА и напряжении 100 В (продолжительность разделения — 1,5 ч). Для визуализации применяли источник ультрафиолета — трансиллюминатор УВТ-1 («Биоком», Россия). Размер ампликонов определяли при помощи маркера молекулярных масс DNA 100 bp + 1,5 Kb + 3 Kb (12 фрагментов от 100 до 3000 п.н.) (M27, «СибЭнзим», Россия).

С целью выявления механизмов формирования участков генома, фланкированных инвертированными последовательностями, изучили фрагмент длиной 1920 п.н. из спектра полученных у крупного рогатого скота. Этот фрагмент был выделен из агарозного геля с помощью набора для элюции ДНК Diatom DNA Elution («Изоген», Россия) в соответствии с рекомендациями производителя. Секвенирование ДНК проводили в Межинститутском центре коллективного пользования «Геном» ИМБ РАН (<http://www.genome-centre.narod.ru/>, организован при поддержке РФФИ).

Поиск гомологичных последовательностей в GenBank осуществляли с помощью алгоритмов семейства BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Выявление инвертированных повторов внутри секвенированного фрагмента выполняли в программе <http://mobile.genouest.org/cgi-bin/Mobile/>, поиск гомологии в архиве повторов — с применением программ <http://www.repeatmasker.org/> и <http://www.girinst.org/censor/>.

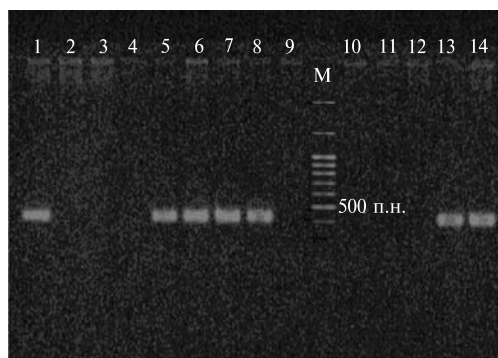


Рис. 1. Продукты амплификации, полученные в PCR с ДНК лошадей: М — маркер молекулярных масс DNA 100 bp + 1,5 Kb + 3 Kb (M27, «СибЭнзим», Россия); дорожки 1, 5, 6, 7, 8, 13, 14 — жеребцы, 2, 3, 4, 9, 10, 11, 12 — кобылы. Праймеры: лидирующий — (AG)₉C-CCA-TGG, терминирующий — (AG)₉C-GAAAGAGC.

исходного праймера (AG)₉C и восемь нуклеотидов из секвенированного

Результаты. Ранее нами было обнаружено, что видоспецифичный для лошадей продукт амплификации длиной 416 п.н. в спектре, полученном с праймером (AG)₉C, может быть результатом рекомбинаций эволюционно старых и молодых мобильных генетических элементов (5, 6). К этому фрагменту подобрали лидирующий и терминирующий праймеры для полимеразной цепной реакции (PCR), из которых первый представлял собой соответственно часть последовательности исходного праймера (AG)₉C и шесть нуклеотидов из секвенированного ампликона лошади (CCATGG), второй — часть последовательности

фрагмента ДНК лошади (GAAAGAGC).

Применение сконструированных праймеров в PCR позволило получить у представителей разных пород лошадей продукт амплификации ожидаемой длины (416 п.н.). Однако оказалось, что из всех исследованных особей, ДНК которых использовали в качестве матрицы в PCR, он обнаруживается только у жеребцов (рис. 1).

Такие данные давали основание предположить, что у домашней лошади этот участок ДНК локализован в Y-хромосоме, фланкирован инвертированным повтором микросателлита (AG)₉ и образовался в результате рекомбинаций между древним ДНК-транспозоном (7), эндогенным ретровирусом (endogenous retrovirus — ERV MLT1G2) (8), впервые описанными соответственно у рыб *Danio rerio* и у человека, а также ретротранспозоном домашней лошади ERV1 (9, 10).

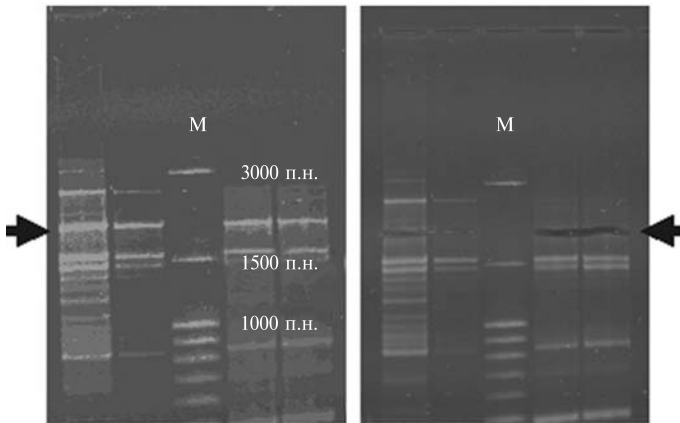


Рис. 2. Продукты амплификации, полученные на геномной ДНК крупного рогатого скота при использовании указанной пары праймеров: М — маркер молекулярных масс DNA 100 bp + 1,5 Kb + 3 Kb (M27, «СибЭнзим», Россия). Стрелками отмечен фрагмент ДНК (слева; справа — гель после вырезания полосы фрагмента), который в дальнейшем секвенировали. Праймеры: лидирующий — (AG)₉C-CCA-TGG, терминирующий — (AG)₉C-GAAAGAGC.

длиной 1920 п.н., который проявлялся только при использовании обоих указанных праймеров в одной реакции, секвенировали и определили полную последовательность 482 нуклеотидов на левом фланге фрагмента и 315 нуклеотидов — на правом.

На левом фланге этого фрагмента с помощью программ Repeat-masker и Sensor обнаружили присутствие двух эндогенных ретровирусов крупного рогатого скота (в позициях 6-212 п.н. — фрагмент последовательности ERV1-2-LTR_BT, или LTR/ERV1, степень гомологии более 94 %, девять транзиций, одна трансверсия, четыре делеции; в позициях 213-416 п.н. — ERV2-1-I_BT, или LTR/ERVК, более 70 % гомологии, 28 транзиций, 30 трансверсий, три делеции). На правом фланге располагалась последовательность ERV_classII, или BT-LTR1B, длиной 305 п.н. с 97 % гомологии, двумя транзициями, одной инверсией, а также с семью моно- и двумя динуклеотидными делециями.

Таким образом, концевые участки амплифицированного фрагмента генома крупного рогатого скота, полученные при использовании флангов амплифицированного фрагмента ДНК из генома лошади в составе праймеров, представляют собой результат рекомбинаций эндогенных ретровирусов I и II классов. Известно, что эндогенные ретровирусы млекопитаю-

Для выяснения представленности этого фрагмента в геномах других млекопитающих исследовали образцы ДНК крупного рогатого скота казахской белоголовой и якутской пород. При PCR с теми же праймерами, что и в варианте с ДНК лошади, получили сложные спектры продуктов амплификации, включавшие ряд фрагментов (рис. 2). Один из ампликонов для ДНК крупного рогатого скота (показан стрелкой, см. рис. 2)

щих подразделяются на три класса в зависимости от их происхождения от экзогенных ретровирусов, которое оценивается на основании гомологии последовательностей. Так, для ERV I класса предполагается тесная связь с ретровирусами *Gammaretrovirus* и *Epsilonretrovirus*; для ERV II класса — с *Alpharetrovirus*, *Betaretrovirus*, *Deltaretrovirus* и *Lentivirus*; для ERV III класса — со *Spumavirus* (10).

При оценке полноразмерной последовательности ампликона длиной 1920 п.н. из генома крупного рогатого скота с использованием алгоритмов BLASTn выполнили поиск гомологии одновременно к обеим секвенированным последовательностям как его левого (482 п.н.), так и правого (315 п.н.) терминального участка. Для секвенированных последовательностей только на хромосоме 15 мы обнаружили участок длиной 1921 п.н. (GenBank: NC_007313.5), концы которого имели длину 482 п.н. и 315 п.н. и оказались на 95 % гомологичными полученным сиквенсам, что позволило предполагать соответствие этого участка получаемому нами продукту амплификации (см. рис. 2).

С использованием программ Repeatmasker и Sensor в этой полноразмерной последовательности выполнили поиск повторов. Оказалось, что в позиции с 5 п.н. по 938 п.н. гомология выделенного участка и видоспецифичного для крупного рогатого скота эндогенного ретровируса BTLTR1B (ERV2) (11) составляет 96 %, с 976 п.н. по 1674 п.н. фрагмент более чем на 70 % гомологичен последовательности эндогенного ретровируса ERV2-1_TSy-I, впервые описанного у обезьян *Tarsius tarsier* (12), а с позиции 1675 п.н. по 1921 п.н. в обратном направлении участок длиной 256 п.н. обладает 92 % гомологией к последовательности эндогенного ретровируса крупного рогатого скота ERV1-2-LTR_BT (ERV1) (13) (рис. 3).

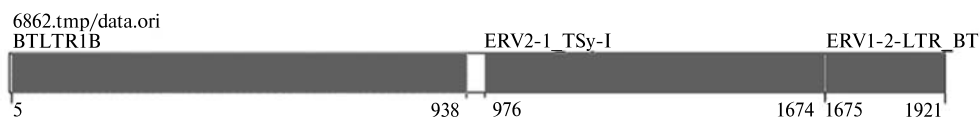


Рис. 3. Распределение участков гомологии к фрагментам эндогенных ретровирусов в нуклеотидной последовательности на участке хромосомы 15 у крупного рогатого скота (GenBank: NC_007313.5).

Полученные данные свидетельствуют о том, что у крупного рогатого скота продукты амплификации размером 1921 п.н., фланкированные праймерами, комплементарными к фрагменту геномной ДНК лошади длиной 416 п.н., так же как у лошади, представляют собой результат рекомбинации эндогенных ретровирусов. Причем у лошади это рекомбинация между видоспецифичным эндогенным ретровирусом ENV1 и более древним, впервые описанным у человека ERV3, а у крупного рогатого скота — между видоспецифичным BТENV1 (*Bos taurus* ENV1) и ENV2, описанным у обезьян и специфичным для крупного рогатого скота (BТENV2 — *Bos taurus* ENV2). То есть, так же как у лошади, в секвенированном фрагменте участок видоспецифичного эндогенного ретровируса ENV1 позиционирован с последовательностью эндогенного ретровируса, впервые описанного у приматов, хотя и другого класса (для лошади — ENV3, для крупного рогатого скота — ENV2).

Связь между микросателлитами и ретротранспозонами прослеживается во многих исследованиях. Например, в геноме крупного рогатого скота 39 % микросателлитных локусов с кором AGC ассоциированы с ретротранспозоном Bov-A2 SINE, эволюционно молодым и видоспецифичным для генома крупного рогатого скота (14). Обнаружено, что большая

часть ретротранспозонов встречается в интронах, причем в них преобладает сочетание ретротранспозона и микросателлита (15).

Известно, что большая часть генетического материала, в частности у животных, представлена ретротранспозонами: в секвенированных геномах у крупного рогатого скота они занимают 46,5 % (14), у домашней лошади — 36 % (16). Выраженный полиморфизм и видоспецифичность ретротранспозонов, высокая скорость их дивергенции даже за короткое время расхождения групп организмов от общего предка, наглядно описанная на примере геномов мышей лабораторных линий (17), позволяют полагать, что основным источником геномной изменчивости служат мобильные генетические элементы. Выявленные нами совпадения флангов фрагментов ДНК, полученных в PCR с праймером (AG)₉C у лошадей и крупного рогатого скота, несмотря на разную длину этих фрагментов и видоспецифичность участия в их формировании разных эндогенных ретровирусов, свидетельствуют о том, что ISSR-PCR маркеры могут отражать особенности геномного распределения микросателлитных локусов и продуктов рекомбинации эндогенных ретровирусов в геномах крупных млекопитающих. Результаты наших экспериментов, по-видимому, отражают тесные связи между микросателлитами и ретротранспозонами, а также вовлеченность ретротранспозонов в сложные рекомбинационные события, касающиеся геномного ландшафта у крупных млекопитающих.

Отметим, что к выраженным особенностям геномного размножения ретротранспозонов относится волнообразная динамика возникновения, распространения и деградации. Для целого ряда ретротранспозонов описаны эволюционные циклы, включающие вертикальную или горизонтальную передачу, вспышку транспозиций с происходящим затем разрушением большинства первоначальных копий (18). Следы таких циклов проявляются присутствием разных видов их множественных остатков в хромосомах (5, 19, 20). Мобильные генетические элементы могут перемещаться по геному с высокой частотой (по сравнению с источниками других мутаций), со скоростью от 10^{-3} до 10^{-5} на один элемент на одно поколение (даже до 10^{-2} при некоторых специфических скрещиваниях). Тем не менее, судя по полученным нами данным, а также имеющимся в литературе сведениям, сохраняется определенное постоянство близкой локализации и повышенной частоты рекомбинаций между микросателлитными повторами и разными эндогенными ретровирусами.

Итак, результаты изучения продуктов амплификации участков ДНК, фланкированных инвертированным повтором микросателлита с коровым мотивом AG, свидетельствуют о том, что у разных видов животных, в частности у домашней лошади и крупного рогатого скота, в геноме имеются области, которые образованы при рекомбинации между последовательностями эндогенных древних ретровирусов млекопитающих и эволюционно более молодых видоспецифичных ретровирусов. По-видимому, именно связь микросателлитов с эндогенными ретровирусами может лежать в основе высокого полиморфизма в tandemных повторах. Эти данные открывают новые возможности для геномного сканирования за счет использования в качестве якорей не только микросателлитных локусов, но и участков длинных терминальных повторов эндогенных ретровирусов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lowry D.B. Landscape evolutionary genomics. *Biol. Lett.*, 2010, 6: 502-550.
2. Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. Genome fingerprinting by sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 1994, 20: 176-183.
3. Cook G.W., Konkel M.K., Major J.D., Walker J.A., Han K., Batzer M.A.

- Alu pair exclusions in the human genome. *Mobile DNA*, 2011, 2(10): 1-16.
4. Глазко В.И. Нано- и микромасштабы в организации генетического материала: к вопросу о «хромосомных полях» Лима-де-Фария. Доклады академии наук, 2011, 436(2): 267-269.
 5. Глазко В.И., Феofilov A.B., Бардуков Н.В., Глазко Т.Т. Видоспецифичные ISSR-PCR маркеры и пути их формирования. Известия ТСХА, 2012, 1: 118-125.
 6. Glazko V.I., Bardukov N.V., Pheophilov A.V., Sipko T.P., Elkina M.A., Glazko T.T. Polymorphism of ISSR and IRAP markers in genomes of musk-oxen (*Ovibos moschatus*) and horse (*Equus caballus*) of Altai breed. *Izvestia of Timiryazev Agricultural Academy*, 2012, Special Issue: 16-26.
 7. Bao W., Jurka J. DNA transposons from zebrafish. *Repbases Reports*, 2008, 8(11): 1720.
 8. Smit A.F. Identification of a new, abundant superfamily of mammalian LTR-transposons. *Nucl. Acids Res.*, 1993, 21(8): 1863-1870.
 9. Jurka J. Putative non-autonomous ERV1-type endogenous retrovirus from horse. *Repbases Reports*, 2008, 8(5): 601.
 10. Gifford R., Kabat P., Martin J. et al. Evolution and distribution of class II-related endogenous retroviruses. *J. Virol.*, 2005, 79: 6478-6486.
 11. Jurka J. Long terminal repeats from domestic cow. *Repbases Reports*, 2008, 8(8): 847-847.
 12. Jurka J. Endogenous retroviruses from tarsier. *Repbases Reports*, 2010, 10(9): 1202-1202.
 13. Kohany O., Jurka J. LTR retrotransposons from cow. *Repbases Reports*, 2008, 8(6): 674-674.
 14. Tellam R.L., Worley K.C. The genome sequence of taurine cattle: a window to ruminant biology and evolution. *Science*, 2009, 324: 522-528.
 15. Wang D., Su Y., Wang X., Lei Y., Yu J. Transposon-derived and satellite-derived repetitive sequences play distinct functional roles in mammalian intron size expansion. *Evolutionary Bioinformatics*, 2012, 8: 301-319.
 16. Wade C.M., Giulotto E., Sigurdsson S. et al. Genome sequence, comparative analysis, and population genetics of the domestic horse. *Science*, 2009, 326(5954): 865-867.
 17. Nelleker C., Keane T.M., Yalcin B. et al. The genomic landscape shaped by selection on transposable elements across 18 mouse strains. *Genome Biology*, 2012, 13(R45): 1-21.
 18. Carareto C.M.A. Tropical Africa as a cradle for horizontal transfers of transposable elements between species of the genera *Drosophila* and *Zaprionus*. *Mobile Genetic Elements*, 2011, 1(3): 179-186.
 19. Garcia-Etxebarria K., Jugo B.M. Genome-wide detection and characterization of endogenous retroviruses in *Bos taurus*. *J. Virol.*, 2010, 84: 10852-10862.
 20. Van der Kuyl A.C. Characterization of a full-length endogenous beta-retrovirus, EqERV-Beta1, in the genome of the horse (*Equus caballus*). *Viruses*, 2011, 3: 620-628.

¹ФГБОУ ВПО Российский государственный аграрный университет—МСХА им. К.А. Тимирязева, 127550 г. Москва, ул. Тимирязевская, 49, e-mail: vglazko@yahoo.com;

Поступила в редакцию 11 января 2013 года

²ГНУ Всероссийский НИИ животноводства Россельхозакадемии, 142132 Московская обл., Подольский р-н, пос. Дубровицы

ISSR-PCR AND MOBILE GENETIC ELEMENTS IN GENOMES OF FARM MAMMALIAN SPECIES

V.I. Glazko¹, E.A. Gladyr², A.V. Feofilov¹, N.V. Bardukov¹, T.T. Glazko¹

S u m m a r y

Highly polymorphic ISSR-PCR markers, the DNA fragments flanked by invert microsatellite repeats, are widely applied with the aim of the genomic scan (polyloci genotyping). The sequencing of such DNA fragments from domestic horse and cattle genomes testified the close connection between the inverted microsatellite repeats and products of recombination between endogenous retroviruses. Mutual genomic positioning of microsatellites and endogenous retroviruses as a source of polymorphisms of ISSR-PCR markers was discussed.

Новые книги

Гудин В.А., Лысов В.Ф., Максимов В.И. **Физиология и этология сельскохозяйственных птиц**. СПб: изд-во «Лань», 2010, 336 с.

Издание хорошо иллюстрировано, представляет современные данные в этих областях науки, соответствует перспективам раз-

вития птицеводства, обеспечивает профессиональную подготовку специалиста — зооинженера и ветеринарного врача. Рекомендуется для студентов высших учебных заведений по этим и смежным с ними специальностям биологического профиля, специалистам-птицеводов, слушателей ФПК.