

**ISSR-PCR МАРКЕРЫ И МОБИЛЬНЫЕ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЭЛЕМЕНТЫ
В ГЕНОМЕ ДОМАШНЕЙ ЛОШАДИ *Equus caballus***Н.В. БАРДУКОВ¹, А.В. ФЕОФИЛОВ¹, Т.Т. ГЛАЗКО^{1, 2}, В.И. ГЛАЗКО^{1, 2}

Закономерности и причины различий в полиморфизме отдельных микросателлитов, как и видоспецифичность такой изменчивости до сих пор остаются недостаточно исследованными. Тест-системы, разработанные Международной ассоциацией по генетике животных (International Society of Animal Genetics) для генетической паспортизации сельскохозяйственных животных, оценки межпородных взаимосвязей, консолидированности пород, включают небольшое число маркеров. Поэтому для животных сельскохозяйственных видов более простым и эффективным методом полилокусного генотипирования служит использование фрагментов микросателлитных локусов в качестве ПЦР-праймеров. Нами предложен метод выявления в секвенированных последовательностях позиционирования инвертированных повторов участков микросателлитов. Были исследованы алтайская порода ($n = 96$), рысистые породы ($n = 48$), караевская порода ($n = 34$) домашней лошади *Equus caballus*. Проанализированы нуклеотидные последовательности для фрагментов (ожидаемая длина/фактическая длина) разной локализации: 1250-1350/1326 п.н. (17-я хромосома), 1250-1350/1302 п.н. (2-я хромосома), 1250-350/1296 п.н. (X-хромосома), 1250-1350/1287 п.н. (20-я хромосома), 980/986 п.н. (23-я хромосома), 800-900/900 п.н. (24-я хромосома), 800-900/876 п.н. (X-хромосома), 800-900/871 п.н. (18-я хромосома), 800-900/857 п.н. (3-я хромосома), 800-900/832 п.н. (6-я хромосома), 800-900/823 п.н. (19-я хромосома), 740/739 п.н. (16-я хромосома), 580/585 п.н. (1-я хромосома), 550/637 п.н. (X-хромосома), 550/572 п.н. (10-я хромосома), 500/494 п.н. (1-я хромосома), 490/489 п.н. (28-я хромосома), 380/378 п.н. (11-я хромосома), 380/377 п.н. (21-я хромосома), 360 (370)/364 п.н. (5-я хромосома), 310/309 п.н. (5-я хромосома). Рассчитан индекс PIC (polymorphic information content). Выявленные в геноме домашней лошади фрагменты ДНК (99 участков), фланкированные инвертированным повтором (GA)₉C, содержали участки гомологии к мобильным генетическим элементам. При их сопоставлении с продуктами амплификации, полученными в полимеразной цепной реакции у представителей ряда пород лошадей с использованием в качестве праймера последовательности (GA)₉C, выделены близкие по размеру консервативные и полиморфные фрагменты ДНК. Оказалось, что фрагменты ДНК, полиморфные у разных животных, в большинстве случаев несут последовательности, гомологичные фрагментам ретротранспозонов (в частности, ERV III), тогда как консервативные гомологичны участкам ДНК транспозонов. В исследованных фрагментах геномной ДНК лошади, фланкированных инвертированным повтором (GA)₉C, наблюдается увеличенная плотность нуклеотидных последовательностей, потенциально предрасположенных к формированию G₄ квадруплексов, что, по-видимому, может быть ассоциировано с повышенной активностью рекомбинаций в этих участках. Полученные данные позволяют предполагать связь между полиморфизмом фрагментов ДНК, фланкированных инвертированными повторами микросателлитов, и мобильностью ретротранспозонов.

Ключевые слова: ISSR-PCR, анонимные ДНК-маркеры, *Equus caballus*, ДНК-транспозоны, ретротранспозоны, неканонические структуры ДНК.

Генотипирование по микросателлитным локусам получило широкое распространение в популяционной генетике, особенно при решении таких актуальных задач, как контроль генетической структуры сельскохозяйственных видов, выявление сорто- и породоспецифичных особенностей их генофондов (1). Международной ассоциацией по генетике животных (International Society of Animal Genetics — ISAG) разработаны тест-системы для разных сельскохозяйственных видов, рекомендованные при генетической паспортизации животных, оценке межпородных взаимосвязей и консолидированности пород (<http://www.frontiersin.org>). В то же время закономерности и причины различий в полиморфизме отдельных микросателлитов, видоспецифичность такой изменчивости до сих пор остаются недостаточно исследованными. Кроме того, предложенные тест-системы (<http://www.frontiersin.org>) включают не более двух десятков маркеров. В этой связи именно для животных сельскохозяйственных видов более простым и эффективным методом полилокусного генотипирования

признается использование фрагментов микросателлитных локусов в качестве ПЦР-праймеров, позволяющее за одну-две постановки реакции оценивать полиморфизм нескольких десятков фрагментов ДНК, фланкированных инвертированным повтором такого праймера (inter-simple sequence repeat PCR — ISSR-PCR маркеры) (2).

Следует отметить, что применение в качестве одного праймера в ПЦР консенсусного фрагмента высокоповторенных последовательных ДНК успешно используется для геномного сканирования и выявления полиморфизма различных геномных районов у человека (3). Обнаружена достаточно высокая частота инвертированных повторов таких последовательностей на небольших расстояниях, что позволяет в одной ПЦР с одним праймером выявлять полиморфные участки ДНК (4). В геноме домашней лошади около 36 % нуклеотидов входят в диспергированные повторы; микросателлиты занимают около 2 % генома (5). Тем не менее, с использованием ISSR-PCR маркеров можно получать полилокусные спектры фрагментов ДНК, полиморфизм которых достаточно надежно отличает одну породу лошадей от другой (6). Ранее в наших исследованиях число выявленных в ПЦР фрагментов ДНК, фланкированных инвертированным повтором (ФИП) микросателлита, и их полиморфизм зависели от нуклеотидной последовательности праймера (6). В полученных спектрах продуктов амплификации выделялись участки, консервативные и высокополиморфные у всех исследованных лошадей.

Для того чтобы оценить возможные причины описанных различий по консервативности и полиморфизму, мы сопоставили данные по экспериментально наблюдаемому полиморфизму локусов и первичной структуре участков близкой длины, фланкированных инвертированным повтором микросателлита, который использовался в качестве ПЦР-праймера, в секвенированных последовательностях генома лошади из GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Методика. Исследования выполнялись на геномной ДНК следующих пород домашней лошади *Equus caballus*: алтайская (48 образцов из хозяйства «Энчи» и 48 образцов из СПК «Чингиз», Алтайский край); группа лошадей рысистых пород, содержащихся в конезаводе «Поворот В.П.» (Московская обл.) (7 образцов от американских рысаков, 6 — от русских рысаков, 4 — от орловских рысаков, 31 — от помесных русских рысаков, улучшенных американскими рысаками); карачаевская порода (34 образца).

ДНК выделяли из образцов периферической крови с помощью набора ДНК-Экстран 1 («Синтол», Россия). Для исследования генетической структуры и полиморфизма внутри вышеуказанных пород лошадей применили полимеразную цепную реакцию (ПЦР) ISSR-PCR (inter-simple sequence repeat PCR), в которой в качестве праймера использовали нуклеотидную последовательность (GA)₉C. ПЦР выполняли в амплификаторе Терцик («ДНК-технология», Россия) в следующем режиме: первичная денатурация (94 °С, 2 мин); денатурация (94 °С, 30 с), отжиг (55 °С, 30 с), элонгация (72 °С, 2 мин) — 35 циклов; финальная элонгация (72 °С, 10 мин). Для проведения ПЦР использовали наборы реагентов PCR Core («Биоком», Россия) и ПЦР-РВ (ПЦР в реальном времени) («Синтол», Россия). Продукты амплификации, окрашенные в растворе бромистого этидия, разделяли в 1,5 % агарозном геле с последующей визуализацией на трансиллюминаторе УВТ-1 («Биоком», Россия). Длины полученных фрагментов оценивали с помощью маркера молекулярных масс М 27 (100 bp + 1,5 Kb + 3 Kb, 12 фрагментов от 100 до 3000 п.н., «СибЭнзим», Россия).

Индекс PIC (polymorphic information content) вычисляли по форму-

ле: $PIC = 2f(1 - f)$, где f — частота одного из двух аллелей, рассчитанная как $f = \sqrt{R}$, где R — частота вариантов, у которых отсутствовал фрагмент ДНК соответствующей длины (гомозиготы по «рецессивному» аллелю).

Результаты. Экспериментальные спектры ДНК-фрагментов ФИП $(GA)_9C$ у исследованных пород лошадей. Напомним, что ISSR-маркеры характеризуются доминантным типом проявления. В спектрах ампликонов, которые мы получили с праймером $(GA)_9C$ в ISSR-PCR (табл. 1) на геномной ДНК лошадей разных пород, суммарно присутствовали 20 фрагментов (до 20 000 п.н.), при этом 11 из них ока-

1. Значения индекса полиморфного информационного содержания локуса (PIC) у исследованных пород домашней лошади *Equus caballus* по результатам ISSR-PCR

Длина локуса, п.н.	PIC по породам			
	рысистые	алтайская	карачаевская	по всем
1880	0	0	0	0
1700	0	0	0	0,43
1600	0,49	0	0	0,38
1580	0,27	0,19	0	0,11
1400	0	0	0	0
1300	0	0	0	0
1200	0	0	0	0
1100	0,43	0,50	0	0,42
980	0,41	0,48	0	0,49
950	0	0	0	0
900	0	0	0	0
880	0	0,43	0	0,29
840	0,43	0,35	0	0,29
740 ¹	—	0,44	—	—
580	0	0	0	0
550	0	0,35	0,28	0,29
500	0,43	0,35	0,47	0,44
490	0	0	0	0
390	0	0	0	0
360 ¹ (370)	0,47	0,40	—	—
PIC_{cp}	0,14	0,15	0,04	0,17

Примечание. Прочерки означают, что у карачаевской лошади не учитывали фрагменты меньшей длины, чем 390 п.н.; 1 (в верхнем индексе) — опубликованные данные (6). В качестве праймера использована последовательность $(GA)_9C$.

зались полиморфными хотя бы у одной из исследованных пород. При расчете индекса полиморфного информационного содержания локуса (PIC) каждый фрагмент ДНК рассматривали как отдельный локус. Наибольший полиморфизм отмечали у лошадей алтайской породы, наименьший — у карачаевской. Полиморфными оказались фрагменты ДНК 1700, 1600, 1580, 1100, 980, 880, 840, 740, 550, 500 и 360 п.н.; консервативными — 1880, 1400, 1300, 1200, 950, 900, 580, 490, 390 п.н. При этом полиморфизм каждого локуса в значительной степени варьировал в зависимости от породной принадлежности животных.

Расчетные спектры

спектры ДНК-фрагментов ФИП $(GA)_9C$ в секвенированных последовательностях генома домашней лошади (*Equus caballus*, GenBank). Для выявления внутренней структуры полученных в результате ISSR-PCR полиморфных и мономорфных фрагментов ДНК, фланкированных инвертированным повтором $(GA)_9C$, были разработаны алгоритмы на языке Python 2.7.3 (<http://www.python.org/>):

```
import re
f=open("chromosome1.txt", "r")
for line in f.readlines():
    print
re.findall(r".....AGAGA[^\...]{0,4}GAGAGAC[^\...]{50,2000}GTCTCTC[^\...]{0,4}TCTCT.....", line)
f.close(),
```

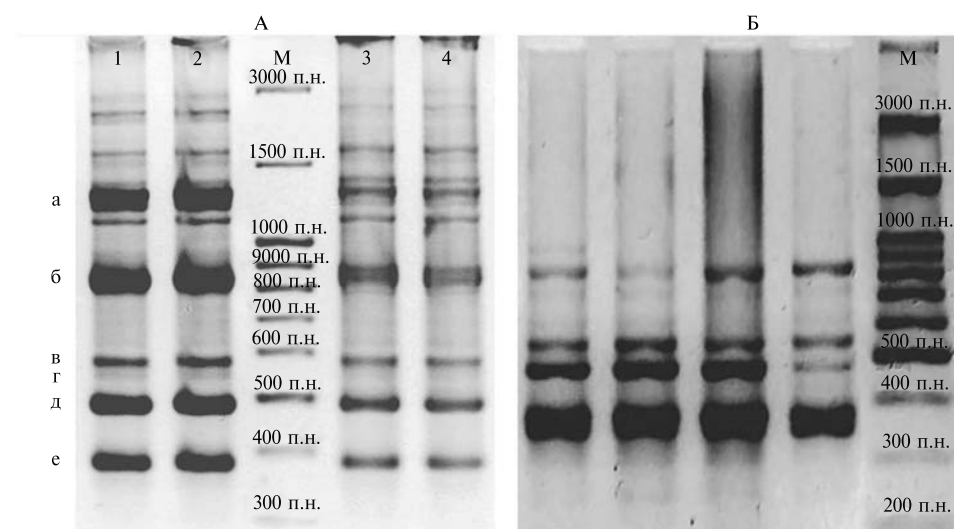
где chromosome1.txt — файл из GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) для хромосомы с удаленными в текстовом редакторе пробелами и переносами строк (в анализ включали последовательно все аутосомы и X-хромосому лошади);AGAGA[^\...]{0,4}GAGAGAC — прямая последовательность для праймера $(GA)_9C$, где точками указывались нуклеотиды, которые могли быть неспаренными; [^\...]{0,4} — символ, которым задается шаг длиной не более 4 нуклеотидов после жестко детерминированных 7 нуклеотидов с 3'-конца праймера; GTCTCTC[^\...]{0,4}TCTCT..... — инвертированная последовательность праймера в той же цепи ДНК; {50,2000} — указание нук-

леотидного промежутка между сайтами отжига праймера. Алгоритм поиска возможных амплифицируемых последовательностей ДНК предполагал, что не менее 7 нуклеотидов с 3'-конца праймера должны отжигаться точно и не менее 12 нуклеотидов — иметь комплементарность к праймеру (GA)₉C. Такое условие основано на экспериментальных исследованиях (7, 8) об источниках ошибок при отжиге праймеров в ПЦР.

Длина последовательности между предполагаемыми сайтами отжига праймеров по условиям поиска составляла не менее 50 и не более 2000 нуклеотидов. До начала работы с сиквенсами хромосом все строки необходимо было объединить в одну, что выполнялось при помощи текстового редактора или программы BioEdit, представленной в свободном доступе (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit>).

В качестве внутреннего контроля с использованием тех же подходов выделяли и рассматривали фрагменты секвенированных последовательностей ДНК, на флангах которых локализованы прямые повторы последовательности (GA)₉C.

Сравнение спектров экспериментальных и расчетных фрагментов ДНК ФИП (GA)₉C в геноме домашней лошади. Электрофоретические спектры продуктов амплификации участков ДНК (ампликонов) были представлены зонами с различной интенсивностью окрашивания, что допускает наличие в них фрагментов ДНК с близкими длинами. Условно мы обозначили зоны как мажорные (наиболее крупные и интенсивно окрашенные) и минорные. Для того чтобы уточнить возможность присутствия в мажорных зонах нескольких фрагментов ДНК, были выполнены исследования, в которых на одной и той же геномной ДНК проводили ПЦР при разных температурах отжига. В спектрах ампликонов, полученных с праймером (GA)₉C (рис., А), выделились две крупных зоны в размерном диапазоне примерно 800-900 п.н. и 1250-1350 п.н., которые при повышении специфичности ПЦР за счет увеличения температуры отжига до 62 °С превращались в кластеры, состоящие из групп ампликонов, и смещались вверх (см. рис., А).



Пример спектра ампликонов ISSR-PCR с праймером (GA)₉C для генома домашней лошади *Equus caballus* при разных температурах отжига (А) и использовании лиофилизированной полимеразы (Б, температура отжига 55 °С): 1, 2 — 55 °С; 3, 4 — 62 °С; М — маркер молекулярных масс М 27 («СибЭнзим», Россия); а, б — соответственно кластеры 1250-1350 п.н. и 800-900 п.н., в — бэнд ~ 590 п.н., г — вероятный гетерогенный бэнд ~ 559 п.н., д, е — мажорные бэнды соответственно ~ 490 п.н. и ~ 380 п.н.

Сопоставив данные о последовательностях ДНК, найденных в секвенированных хромосомах лошади с использованием описанных выше алгоритмов поиска, с результатами, полученными при электрофоретическом разделении продуктов амплификации, мы выявили соответствие экспериментальных и расчетных длин для многих участков.

Так, для кластера 1250-1350 п.н. фрагментами ДНК с высококомплементарными предполагаемыми сайтами отжига праймеров были последовательности 1326 п.н. (локализована в 17-й хромосоме, имеет комплементарные сайты отжига праймеров по всей длине последних), 1302 п.н. (2-я хромосома), 1296 п.н. (X-хромосома), 1287 п.н. (20-я хромосома). Разделение зон на кластеры при увеличении температуры отжига праймера соответствовало повышению точности отжига в найденных фрагментах ДНК (см. рис., табл. 2).

2. Фланкированные инвертированным повтором (GA)₉C нуклеотидные последовательности в секвенированном геноме домашней лошади *Equus caballus*, соответствующие размеру ампликонов в ISSR-PCR, и их предрасположенность к формированию G₄ квадруплексов

Длина фрагмента ДНК 1250-1350/1326 п.н. (17-я хромосома, PIC «←») GGAAGAGAGAGAGAGACAGACCGTGGTCATTGATCCCTGAATGTAGGTTTGCTGAG ACCAGCACTCAGTCTGACTCCTCAGTATGTGAGCCAGCATATTACTTTTCTTCATAAA GAGGTTTGAGTTGGGTTTCTGACACTGGCACTGAGAGAGTCTGAGTAACCTAAATATGG AAATAAATGGAAATATACCAAAATGAAGACATATGTAAGAAAGGAGAACTCCTCTGATG TGTGCAACAGTGAAGAAAGCTCATCAATCTGAAGCAGCTCCGAGACAGCTGAAGTCGAC AGATCCTAGGGTCTTACCATAATCATACTAATTTTGTATATGTGATGCTTTAAAAATA TCACACATATCTTTACAAAGTATAATTTTTTAATTTATTTTTCTCTCCCTTTTAAAG AAGGAGATTCTAGAATACAAATGGAGCTCAAGGAATATATCATCCTTTTCAGCATGCCTT AAAGTTCTGTATCAACAATGAATTTATGATGTGAAAGGGGTTTATGTTTCTGAAAAT TATTATAATAGGGATTATTTAAAAATATGATTTGAAGCATTAACATATTTACTTATTTG CACCTTTTATATATAGTTTTATATTTAAAAGAAATGTAGCCACATTTCTTCAGTAA TATTGAAACAGTTGAAAAGTTTACCATCATCCTGGACTTTTCTCATTATTGGGAAGTAG AGGAATTTACTGTAAATATTTCAATAATGTTATCTAGTGTAGCTTTTGAGGTTCA AAGTTTTAACCCAGAGAAGACTTTTTATGTACATGGTACTTGAAAATGCAATCATG ACTGAAATGAGTTAATCTAAAACCTGTGAAACAAGAATTAATCACTTATTTGTCAAGATC AAGACATGATGTGCTAATTTATTTAGCACACAGGAGGGCCATCCTATACATACTAAAA CATATTTGGAGGATTGTAGAAATCAACTATATTTGATGAAAACATTTCTGCAAAAATA GCTAAATATAACTGAATAGTTTGAGCTTCTATTTGCTTTTAAATAGTAAATCTCTT TTGGTTGACACAGATATCAATATAATATCAGTACTGTGTAATAGGTTGTATGCTCT TTATTTGCTTTTATGCAATGTAAGTTCACTTGTCTCAATTTTAAATGATTTTCAGACTGGC GTGTTTTGAAGTGTTCATCTTCAATAGTTTCTATCTCCTTCTTACTGTTGAAATCCCA GCTGTCATCTATTCTGTCAATATGTAGCCTTCAGCAATCTCTCAATTCCTCTTTG TCTTCTGGTCTCTCTCTCTCTCTCT

Длина фрагмента ДНК 1250-1350/1302 п.н. (2-я хромосома, PIC «←») GAAAGAGAGAGAGAGACAGGTTCTTTGTGCATTTCGCATCTGTAGTGGGTGTGGG GGTGCATGGTTTATGTTAGTTACATGGTTATGAGGGTGACAACCTGTGTCCTGTCTCA TACCGTCTGGGGATATCATGTGCCCGTCTCACGATCTGGGCGAAGTGACAGGTTATATG CTAGCTATCCTGTTAGGAGGGGTGTCAGTACTGACTTGTGTGCTTGTCTCTGGCTGTGG GTATGTGTGAGGTGTCCCATGTGCCCGTCTGATGTTGTGAGGAGTGACATGTGTGATT ATCTCGTGTGTTGGAGGTTGTCACTAAGTGGGGGTTGTCCTCACCCTAAAGAGAC AACATGTTGCCAGTGGTGTGGGCTGCGGTTGGCAGGCTCCTCCACGCGAGCCACAG GGCCCCAAAGGCTGGCCAGAGGAGCTCTGGGGGCCCTGAGTACAGGGACAGATGTGG GCTGGAGCGAGGCTCTCAGTCCCCTACGACTACCTTCTGGCCCAGGTGCCAACCTTG AGACTGTTCCCCAGGAGGAAGGACCCCGTGTATCTTACACAGTGTGGAAAGGGGCCCTT TGGCTCTGGGCGAAGGTGTGACTGGGGAGGTAGAGCACCAGGCGGCTTACATGGGGGG CTGTGTCCCGCAGGCCTGGGGGGCCCTATTCCTGCCTCTTCTGCCCTGAAACTGTT AAATAATTAAGGCTGTGGAGCCCGCAGGATTAATCGGGGCAGCTCGGCGCGGGCCGGGA GCTCAGGTAGTTCGATTAGTGTGCCCGGGAGGATATTGGATTTCTGAACCGCAAGTCAGC ACTATTCGGGCTGTATCTCTCCGAAGCTTGAGGGTCAGGAGGCGGAGGCCTCCGGGC GCACTGGCCGCCCCCGCCGGCCAGCTCTGGAGCGTCCACTCCCTCCGCCCCACACCCG CAGCCTGTCTGCTGGCTGCTCCCTACCCACTCCCTCCCTGGCTCCCTCCGCCCCACCGCTG CCCACCGGCACCCTACCCAGCCCTTCTCCCTGGCTCACCTGGCCCTACAGTCATGT TCTCTCTCTCTGTTCCCTCTGGCATGACTCCCACTCTGTGCTCCCTGACACCTG CTCTCAGCTCTCACCAGCCTCTCTCCACTTTGGTCTCCATCTCCCTGTCACTGTCTC TGTCCCCCAGTCTCTGTAGCCTCTCCTATCACCACTCTCTGTTTTGTGTTGTGTTT GTGAGTGCCTGTCTTACAGTTCTGTCTGTCTCCATCTCTGTCTCTCTCTCTCTCTCTG TCTG

Длина фрагмента ДНК 1250-1350/1296 п.н. (X-хромосома, PIC «←») GGATGAGAGAGAGAGACATGAATGACAGAGTAAGAGAGACAGATGATGAATAAGTAG ATGACAGAGAGAGATAGATAATAGCTTATTTACTAATTTATTTAGTCATTTACTGTGGC AGACTCCATACTAGATGCTGAGGGCGCAGAGGTTGACTAAGATAAGGGTCCCTGTTTTCA ACAAGCTTGTACATAGTAGGATAAATCAGCTGTCTACCTCCTAGGAGCAGTAGTGGAGT AGACTCAGGCTGGATTTCATCCAGCTAGGAATGCCCTCACCCAGCGGAAACACAGA AAATCCACAGCAGTGCAGGTTCTAGAGGCTAAGGCCTAAAAAGGTAGTCTGAAGAGA ACGGCGTGTGGGAAAAACCTGGGTAGAAATGGTAAACAGGCCAGGCACAGACAAAGGAG

TTAATTTTAAATTTTAACTTAGCTTATTTAAATAAAATGCATTTGGCTAGTGGTC
 AACTGTTGGGAGAGAGACTCTGTCACAAAGATAAATTTTGAGAAAAAAATTTGTTAAAG
 AAGCCTAGTGTGGTCTTATTTTAAATAAACTATCTCTAAGCTCTCAGATTCTCA
 CCTTCATTAATTAACAGAACTATGAAATTTCAAAGGTTCTCAGAAAGTGCACATTT
 GATTTGTAGACAAGGGTAAAGTGGAAAAACAGGTGATTGGGAGTCTGGATTCTCCCTG
 CTTTCCATCTCTACCTTCAACAAAAACAGCATATTTGTATGTGTTTAGTAAATTAAT
 TTTTCACTTAACTTACTCAAATAAAGATTATTCCACTTAAAATCTTTTGTAGAAAC
 CACTACCTTGAACAACAGATTTTATCTATATTCAGGAGCAACATGCAATATCTACCCA
 GTATGTGCCTGTGCATATTTATAGGAAGGGAAAGTCACTATCCATGTAGAAATGATATGA
 GAGGCATAAGAGGTCTCTCCACCTCCAAAGTGTCTCTCTCTCTCACTCAC

Длина фрагмента Д Н К 800-900/871 п.н. (18-я хромосома, PIC «-»)

AGACAGAGAGAGAGAGAGACAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGGGGAGAGAGACTGAC
 TTAAGAGAGGAGCCTGAAGTTGGATCTTGGGGAAGCAGCTCGGAAATATATTATGTTACT
 TGTTTTGTAAATATACTAAGCCAAAGCCAATAGATCAAAAGCAGCACAAAGGAAAAAGGC
 AGGATAACGTAACGAACAGTTTCTGACTAAAATCTCTTACCTCCCCATATGGCTC
 GACACTCCACCATAAGAACAAGACACACACACACACACACACACACACACAGCACACA
 CACGCAAAAACAGTAGAGAGACAGAGAGACAGAGAGAGAGAAAGCATCACTTGCTCT
 AATCAAAATTTCTCTGTTTGTGTTTCTCTCCAGCACCACACACTGCGCCCCCA
 GCGGCCCTCTCCCGGCGCCAGCTCCGGGGCAGGCCGGGGCGCGCGCGATTGTCT
 TCTCTGGAAGAAAGTTGCTCAAGTGGGCGCGGCGCTCCCGCGAGCCGAGGGGTGGG
 CTGCGGGAGGCGGGAGGCCGGGCTGTGGCCGCGCTCCCGCGGAGCTCGGGAGCGCT
 AACGCGGCCCCGCGCCGGTGGATCGGGCTCAGAGCGAGGGGGAACGAGAAGTTTCCTTC
 CCAGTCTGAGCTGGGCTAGTTCTGTTTGTGTTTGGGGGGTTGGTTTTCTTTTAA
 ACTCAGTATCTCCGTCAGCTCCCCCTCGGACCCCTCTTGTCCCAGCTCTCTCCC
 TCCCCAGGCCTCTCTGCGCTTGGCAATCACTTTTCTTTTATTTCCAGGATTT
 GTTTGGGGCTAATACSTAGGGGGTGGTCTCTCTTCTCTCTCTCTCTCT

Длина фрагмента Д Н К 800-900/857 п.н. (3-я хромосома, PIC «-»)

CTGTAAAGAGAGAGAGAGACAATTTGATGTGCAGCTTCTGACTCAGGCTACTGATA
 AGTACAGTTGATGGCAGCATTAGACTCTGTTTATGTTATCTATTGCCAACACTTTAA
 AATGATCTTTCTCATGATCTGTGGTTGACTAGGCTGAGTTGGGTGGTTTTCTCG
 GCCCTTATGGTTCAGCTGAGGGTTACTCAGTTGGTTGCATTTCAGTTAGCATCTGTT
 GGCTAGAAGTTCAACAAGCTTCAACAATAATGCTCACCCTTGTGTTCTCCACGTT
 ATCTTTTACGTCAGTCTGGCTTCCAGTTGAGTTGGTTTGCCTCAGGCTATTCAA
 ACTTTTACCTTCCAGCTGGCTTCAAGGGGGAAAAACAGCAGCTGCTAAGCCTTTAAAG
 CCTAGAAGTGCATTTGCAGAGTGTCACTTCCACTTAATATGAGAACAAACCCAAAT
 CAAGGGAAGGGAGGAGCCAGTCCACTTCTATGAGGAGAGTGGCTTGTGATAGAGTGA
 GGGAAAGAAATGATGGCAGCCATTTTGAAGAATCACCACCAGCCTCATTACTCACT
 TTACATAGCAATTAATTTTATGTTTATGTTTCTTATGTTTCTCAGCTCCCTTTA
 TAAGAACAATCTTACTATACACTTACCAGTTCACGACAGTGTTTTCTGGTCTTTAGGAA
 AAGTGGTCAATTTCTTAATAGTTGTACTATATAGTTAGGCTCAGTTATGTGTCT
 CAGTACTGAGTTTGTCTTTATGTTATATGAGCAAGTCTTACAATAACCTGTGAGGG
 AGATAATTATGTTCT

Длина фрагмента Д Н К 800-900/832 п.н. (6-я хромосома, PIC «-»)

GGTGAAGAGAGGAAGAGAGACAGTGGGCTGAGATCTACGCTGAAACTTATCTGGACAGA
 AAGGATGCCTTAAATCAGGCCCTGACTAAGTGTCTGCACCCCCACATACACACCTTACA
 CAAATCTTTGGAGGGCAAGGGGGAAGAGGTGTAAGGCAACGCAGACGGCAGTTTCT
 ATCTAGGATAAAGAGGACATCAACAATCAAGAAATGTTAGCATATTTCTTTTCC
 TGGAAGTGAGGACCGGGACCAAAAACAGTGCAGGGCATTGTGCTCGAAGTGGCTGG
 AGGAGGCAGTGCATTTAGACAAGATGTTAAAGCTCCCTGCTTCCATGTTTTCATCTGC
 AAATCAGCAGTTACGAGTAACCAAGCCATAGGGTTATGATGAATTTAATGGGATAA
 TCCAAGTCAAGCACTAGCACGTGCTGGCACAAGGTGACGCTCAATAAAGTGAAGT
 CTGTCTATTCTTTGGAGCACCCCGTACTATCTGTCTACCCCTGCTCACCCTGACCCAA
 GGGCTGTGGTTAATTTAGTTGTTCAAAAACCAGCTAGGCAGATGACTGGAAGCCTCAA
 AGTCTGAACASCTGGGGCTTACAAGGGTGAAGTGGAGTACCACCCGGATCTCTCACCTG
 AGGATCCATCTTTGTGAGCCGCCACCCAGCTAGCCTGGGGTCTGTTCCGGGTCTCTCAAG
 TGGGAGACAGCTATGCTGGAGTAGGGCTGACCCTGGACCTGGGTTAGGATTTTCAGGA
 TTGGAAACCTAAGTCTGCCATTTACCAACTTGGTTACCTTGAGCGAGTCTCTCTCTCT
 TAGCAT

Длина фрагмента Д Н К 800-900/823 п.н. (19-я хромосома, PIC «-»)

TAGAGAGAGAGAGAGAGACAGATGGGGGAGGGTGTGGGGGAGGGCGGAGATTCATTGAT
 TGATTTGCAAGGAATGTAAATGCAATTTGTGAGAGCTGTCTGGGCATGTCCCAAATCAGGC
 CATCAGGGAGGGCAGTTGGAAACTCTGGTCAGGAGCAGATGCAGGAGTCCACAGGAA
 ATTTTCTTCTCAGGGAACCTCAGTTCTGTCTGAAGGCCTTCAGCTGAAATGGTTT
 AGGCTCACTGAGATATCCAAGATAGTCTCTTATACAGCCAAGTGTCCCATCACTGAA
 ATACCTCATAGCAACCTGAGCACAAAACCTAGAGTGTGTTCGATTGCATAATA
 GAGTACCATAGCTTAGCCAAGATGACAAAACTAACCATCACAAATAAGTACAAGGGAA
 GGGGCAAGACGCTACTACAGATTTCTTGGACTAGGTGAATGGGGCAATAATATTGGG
 TGTATTTTCGGTAGTGGCCGGCTGACTGGTCCCTGTTTGGGAGGGGGAGTGTGCACAA
 GGTTGCGATGCTGTGTTGTACAGCCAGACCCCTGGTGTACTTTTTCTATCCACG
 CCAATAAACCCTTCTGCTTCCAGTGTATAGCATGAAGTCTAGCTTCACTTTCCAA
 TTCAATCCCGTGTCTGGAAGAAAAATGCCCAAGCAATTTTACCCCATCACAC
 TAGTAATCATTTATTTTCTGATTTGTTCTTTCTCTTTTTCAGCCCTTTGGTAAAT
 TACGAGGGACCCCTTTATCT

Длина фрагмента Д Н К 740¹/739 п.н. (16-я хромосома, PIC = 0,29)

GACAGAGACAGGGAGAGACAGACAGACAGACAGAGACAGAGAGAGAGAGAGAGAAAGTG
 AGCCAGACGAAGCTGATCCCTTTTATGAGCTAGCATCAGAAAAATAAGTCAACAAGAC
 TAAGACTAGCCTTATTAATAGTGAAGGCTTAGATGCGACCAATTTGATGAGAAATGCA
 AGTAATTTTACAGACATTTTAAAACCACACAGTTGATATGTTTCTTCCAGGATGTG
 ATCAACTCATTTCTTAAACATCTCTCTCATATCTAGCCTCTCTCCCCAGCCTATAG
 TTTATCTCAGTACGTGTAATGGTTCAATATGTTTACCAACTGACTAGGTTACAAGA

AGCAAGACTGTCTGGGAACCCAGGAAGAAGGCCCTTACTGAGAACCTAATTGGCAGGCAC
 CTGTCTCTGGACTTCCCATCTCTTATTCTGTGTTTAAAGCCACTCAGTCTATGGTAT
 TTGTTATAGCAGCCCATCTTAGTCATAAGACATACATATATACACATATACGTATAT
 GTGAGTCTGTGTGTGTATATATATATGATTTTTTCCATTTCCATAAATTCATGCAC
 TTCAAAAAATGCCTTCTCTTCTTTTTCATTTCTGTAGAAATAGTACAGTCTCTCTT
 CTCTTCCCCT

Длина фрагмента ДНК 310/309 п.н. (5-я хромосома, PIC «←→»)
 TTTCACAGAGAGAGAGACAGAGACAGAGATGAGAGAGAGAGGACAGGAAATGCAAGA
 GATAACTSTAAATAGAGAGGCAAAAGGGAAGAAATAAGGAACATATAGATAGAATAAT
 ATTATCATTTCCAGAGACTCTCAGTGAATTTCTGTAAAGTCCATAGGGACAGGGCCCTT
 ATCGCCATGTTTCAGGGATTGATTAAGGATGCTCAGCAGGCACTTGACAGAGTGAGCT
 TGTTTCAGTTCTAATCCTTCGAGGAACCATTACTCATTCTGCAACATTGAGCCATGTCTC
 TCTTCCCCTCTCT

Примечание. Представлены результаты анализа сиквенсов из Gen-Bank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) для последовательностей размером до 2000 п.н. на соответствие полученным собственным экспериментальным данным по ISSR-PCR амплификации фрагментов ДНК с праймером (GA)₉C (фактическая длина/расчетная длина). PIC — индекс полиморфного информационного содержания локуса, PIC «←→» означает, что в эксперименте невозможно оценить полиморфизм фрагмента в связи с отсутствием четкого совпадения экспериментальных и расчетных длин фрагментов, 1 (в верхнем индексе) — опубликованные данные (6). Светло-серым выделены сайты отжига праймера, серым — точки ошибки отжига; последовательности, предрасположенные к формированию G₄ квадруплексов, ограничены рамками.

3. Представленность диспергированных повторов различных классов в секвенированных участках генома у домашней лошади *Equus caballus*, фланкированных инвертированным повтором (GA)₉C

Класс	Число	От общего числа повторов, %
ERV/ERV3	47	15,93
DNA/hAT	32	10,85
NonLTR/SINE/SINE2	30	10,17
NonLTR/L1	29	9,83
LTR/Gypsy	28	9,49
NonLTR/CR1	17	5,76
DNA	15	5,08
DNA/EnSpm/CACTA	13	4,41
DNA/Mariner	10	3,39
LTR/Copia	10	3,39
ERV/ERV1	9	3,05
ERV/ERV2	7	2,37
DNA/Ginger2	5	1,69
DNA/Kolobok	5	1,69
LTR/BEL	4	1,36
DNA/Dada	3	1,02
DNA/Harbinger	3	1,02
Interspersed_Repeat	3	1,02
DNA/Helitron	2	0,68
DNA/MuDR	2	0,68
DNA/Polinton	2	0,68
LTR	2	0,68
NonLTR/L2	2	0,68
NonLTR/Tad1	2	0,68
Simple/Sat	2	0,68
DNA/Novosib	1	0,34
DNA/piggyBac	1	0,34
DNA/Transib	1	0,34
DNA/Zator	1	0,34
LTR/DIRS	1	0,34
NonLTR/CRE	1	0,34
NonLTR/I	1	0,34
NonLTR/Rex1	1	0,34
NonLTR/RTE	1	0,34
NonLTR/RTEX	1	0,34
NonLTR/Tx1	1	0,34

Для кластера 800-900 п.н. также были найдены потенциально амплифицируемые участки ДНК из разных хромосом: 900 п.н. (24-я хромосома), 876 п.н. (X-хромосома), 871 п.н. (18-я хромосома), 857 п.н. (3-я хромосома), 832 п.н. (6-я хромосома), 829 п.н. (19-я хромосома). Наибольшую точность отжига имел фрагмент длиной 871 п.н. из 18-й хромосомы (см. табл. 2). Отметим, что при повышении температуры отжига примерно такому размеру фрагмента соответствовала зона, которая четче визуализировалась в виде кластера. Далее на электрофореграмме располагался фрагмент ~ 580 п.н. Согласно расчетам, он мог соответствовать участку длиной 585 п.н., локализованному в 1-й хромосоме (см. табл. 2).

Особый интерес представляла зона, соответствующая 550 п.н. Исходя из найденных нуклеотидных последовательностей, она, вероятно, гетерогенна и включает участки из 10-й хромосомы (полная длина фрагмента 572 п.н.) и X-хромосомы (полная длина 637 п.н.). В каждом из них находились три сайта отжига праймера — по одному прямому и по два обратных. Таким образом, существует возможность амплификации как полных фрагментов (соответственно 572 и 637 п.н.), так и их коротких вариан-

тов (550 и 552 п.н.) (см. табл. 2). Не исключено, что по указанной причине этот участок относился к числу локусов, которые воспроизводились наиболее стабильно, хотя он и не был одним из самых яркоокрашенных.

Мажорный локус длиной около 490 п.н., по-видимому, включал фрагмент ДНК из 28-й хромосомы, имеющий длину 489 п.н. и высокую комплементарность флангов к праймеру (GA)₉C. Мажорная зона ~ 380 п.н. могла состоять из нескольких фрагментов: 377 п.н. (21-я хромосома), у которого последовательности флангов наиболее полно комплементарны праймеру (GA)₉C, и 378 п.н. (11-я хромосома).

Таким образом, в хромосомах домашней лошади было найдено 99 фрагментов ДНК, которые потенциально могут быть амплифицированы в ПЦР с праймером (GA)₉C (фрагменты с наиболее точными сайтами отжига на флангах — см. табл. 2).

Анализ нуклеотидных последовательностей в расчетных спектрах фрагментов ДНК ФИП (GA)₉C. Мы проанализировали 99 участков геномной ДНК лошади, фланкированных инвертированным повтором (GA)₉C и потенциально способных к формированию продуктов амплификации в ПЦР с этим микросателлитом в качестве праймера, на наличие фрагментов мобильных генетических элементов (МГЭ) разных классов с помощью базы данных <http://www.girinst.org> (табл. 3). Оказалось, что наибольшее распространение имеют участки гомологии с эндогенными ретровирусами III класса, которые составляли приблизительно 15,93 % от общего числа всех выявленных МГЭ. На долю гомологии к эндогенным ретровирусам I и II классов приходилось соответственно 3,05 и 2,37 %. Значительно распространенными были участки гомологии к DNA/hAT (10,85 %), NonLTR/SINE/SINE2 (10,17 %), NonLTR/L1 (9,83 %) и LTR/Gypsy (9,49 %).

Оценивая специфичность связи участков гомологии во фрагментах ДНК, фланкированных инвертированным повтором (GA)₉C, именно с этими МГЭ, мы выполнили поиск участков ДНК с прямыми повторами на флангах. Оказалось, что таких участков в секвенированном геноме лошади существенно больше, чем фланкированных инвертированным повтором (GA)₉C (99 фрагментов).

4. Частота мобильных генетических элементов (ЧМГЭ) и доля участков гомологии к ним (ДУГ) во фрагментах ДНК, фланкированных инвертированными и прямыми повторами микросателлита (GA)₉C, по сравнению с долей нуклеотидов МГЭ в секвенированном геноме (ДМГЭГ) у домашней лошади *Equus caballus*

Группа МГЭ	ДМГЭГ, %	Инвертированные повторы		Прямые повторы	
		ЧМГЭ, %	ДУГ, %	ЧМГЭ, %	ДУГ, %
LINE_L1	16,25	10,31	4,83	11,56	9,29
LINE_CR1	0,26	5,84	4,70	6,80	2,85
SINE	2,85	9,97	4,45	13,61	5,63
LTR/Gypsy	—	9,62	5,22	16,33	5,42
LTR_ERV, III класс	1,82	15,81	9,55	7,48	4,17
LTR_ERV, I класс	1,53	3,09	0,96	8,16	4,34
LTR_ERV, II класс	0,07	2,06	0,64	1,36	0,56
DNA/hAT	1,55 ¹	11,34	5,94	3,40	0,90

Примечание. Прочерк означает отсутствие гомологии в секвенированном геноме крупного рогатого скота; 1 (в верхнем индексе) — приведены данные по геному человека (P. Arensburg с соавт. Genetics, 2011, 188: 45-57).

В секвенированной ДНК лошади спектр участков с прямыми повторами (GA)₉C, имеющих гомологию к различным типам МГЭ, существенно отличался от представленного выше (см. табл. 3) по частоте областей гомологии к эндогенным ретровирусам III класса и DNA/hAT (табл. 4).

Интересно отметить, что по нашим данным доля нуклеотидов, приходящихся на области гомологии к эндогенным ретровирусам и особенно к ДНК транспозонов, выше полученной для секвенированного генома домашней лошади (5) (см. табл. 4). Таким образом, можно ожидать, что инвертированные повторы микросателлита (GA)₉C наиболее тесно ассоциированы с участками гомологии к эндогенным ретровирусам III класса, LINE_L1 и DNA/hAT, поскольку в этих участках их доля выше, чем в секвенированном геноме крупного рогатого скота.

5. Предполагаемые рекомбинационные характеристики мобильных генетических элементов (МГЭ) в секвенированных последовательностях генома домашней лошади *Equus caballus*, соответствующих полиморфным и консервативным фрагментам ДНК в ISSR-PCR

Длина фрагмента	PIC	Число, размер, локализация участка, совпадающего по длине	Потенциальные участки рекомбинаций с МГЭ/повторы/класс	Частота образования квадруплексов (не перекрывающиеся/перекрывающиеся)
980 п.н.	0,49	1 (986 п.н., 23-я хромосома)	Полиморфные локусы DNA transposon/hAT/MER103C	3 (G-Score = 11, 13, 14)/ 14 (G-Score = 8, 9, 11, 13, 13, 7, 7, 6, 7, 14, 14, 10, 11)
740 ¹ п.н.	0,29 ¹	1 (739 п.н., 16-я хромосома)	Non-LTR Retrotransposon/L1/L1-8_GM Endogenous Retrovirus/ERV3/MLT1G2 Endogenous Retrovirus/ERV3/MLT1F1 Endogenous Retrovirus/ERV3/MLT2B2	2 (G-Score = 4, 20)/1 2 (G-Score = 3, 4, 2, 3, 4, 4, 5, 5, 20, 20, 19, 20)
550 п.н.	0,29	2 (637 п.н., X-хромосома; 572 п.н., 10-я хромосома)	637 п.н.: LTR Retrotransposon/Gypsy/Gypsy-53_PM-LTR Non-LTR Retrotransposon/L1/L1M6_5end	1 (G-Score = 12)/ 2 (G-Score = 11, 12)
500 п.н.	0,44	1 (494 п.н., 1-я хромосома)	572 п.н.: DNA transposon/Mariner/Tc1/MamRep137 Endogenous Retrovirus/ERV3/LTR33A Endogenous Retrovirus/ERV3/LTR33 DNA transposon/hAT/MER45C	2 (G-Score = 12, 34)/ 438 (G-Score = 4815 — суммарный) 1 (G-Score = 19)/ 46 (G-Score = 563 — суммарный)
900 п.н.	0	1 (900 п.н., 24-я хромосома)	Консервативные локусы DNA transposon/hAT/Homo5	2 (G-Score = 16, 8)/ 3 (G-Score = 16, 15, 8)
580 п.н.	0	1 (585 п.н., 1-я хромосома)	DNA transposon/Dada/Dada-1_CSa	2 (G-Score = 18, 18)/ 14 (G-Score = 17, 18, 16, 17, 13, 14, 17, 11, 18, 12, 4, 13, 14, 18)
490 п.н.	0	1 (489 п.н., 28-я хромосома)	0	2 (G-Score = 15, 12)/ 10 (G-Score = 14, 15, 13, 8, 10, 9, 7, 9, 8, 12)
380 п.н.	0	2 (377 п.н., 21-я хромосома; 378 п.н., 11-я хромосома)	377 п.н.: DNA transposon/Tigger1B_Crp	1 (G-Score = 17)/ 33 (G-Score = 410 — суммарный)
			378 п.н.: Endogenous Retrovirus/ERV3/MLT1C1	1 (G-Score = 10)/ 2 (G-Score = 10, 10)

Примечание. PIC — индекс полиморфного информационного содержания локуса, G-Score — баллы вероятности формирования G₄ (рассчитаны по программе QGRS, цифрами указано число потенциальных G₄). В качестве праймера использована последовательность (GA)₉C; 1 (в верхнем индексе) — данные, опубликованные ранее (5).

Мы детально проанализировали по четыре предполагаемые последовательности для полиморфных и консервативных локусов, исходя из данных о секвенированных участках генома с наиболее высокой точностью отжига праймера, близких по длине соответствующим фрагментам амплификации (см. табл. 2, 5). В результате в четырех полиморфных локусах выявили 11 участков мобильных элементов, из которых к ретротранспозонам (мобильные элементы I класса) относятся 8, то есть 73 % от числа областей гомологии к разным МГЭ. Почти половина из этих 11 уча-

стков (45 %) приходилась на долю эндогенного ретровируса III класса ERV3, тогда как на транспозоны II класса (ДНК-транспозоны) — всего 23 %. В отношении консервативных фрагментов ДНК были обнаружены только четыре участка гомологии с МГЭ, причем три из них — с ДНК-транспозонами (МГЭ II класса). То есть в геноме домашней лошади в полиморфных ISSR-PCR маркерах, выявляемых с (GA)₉C в качестве праймера, по сравнению с консервативными с относительно повышенной вероятностью могут присутствовать участки гомологии к ERV III класса. Напомним, что эндогенные ретровирусы млекопитающих подразделяются на три класса в зависимости от их происхождения от экзогенных ретровирусов, которое оценивается на основании гомологии последовательностей. 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 — с *Spumavirus* (9).

На 1000 п.н. в расчетных участках ДНК, фланкированных инвертированным повтором (GA)₉C и соответствующих по длине полиморфным фрагментам ДНК при использовании этого микросателлита в качестве праймера в ПЦР, приходилось 1,5 участка различных МГЭ. Только в двух фрагментах из 99 исследованных отсутствовали области гомологии к МГЭ. Иными словами, плотность локализации участков гомологии к МГЭ во фрагментах, фланкированных инвертированным повтором (GA)₉C, существенно выше прогнозируемой на основании распространенности таких участков в геноме лошади (5). Полученные данные свидетельствуют о том, что большинство ISSR-PCR маркеров представлены фрагментами ДНК, сформированными при рекомбинациях между различными МГЭ. Это соответствует результатам секвенирования фрагментов ДНК лошади и крупного рогатого скота, фланкированных инвертированным повтором последовательности (GA)₉C, которые мы получили ранее (10, 11).

Возможные причины неполного совпадения экспериментальных и расчетных спектров для фрагментов ДНК ФИП (GA)₉C. Следует отметить, что в силу различных причин полученные экспериментальные спектры фрагментов геномной ДНК не всегда полностью соответствуют теоретически ожидаемым. Например, существует вероятность того, что секвенированные области не включали анализируемый участок либо сам сиквенс оказался неполным (известно, что теломерные и центромерные повторы иногда секвенируются частично) и/или содержал ошибки. Лocus может быть связан с Y-хромосомой лошади, секвенированная последовательность которой не представлена в базе данных (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Дополнительными факторами, вероятно, служат структурные особенности района геномной ДНК, в которой локализован фрагмент с инвертированным повтором микросателлита на флангах.

Наши расчетные данные поиска последовательностей ДНК тоже не всегда совпадали с результатами ПЦР-амплификации. В частности, возникали затруднения при выявлении фрагментов с длиной менее 350 п.н. на электрофореграммах, тогда как в расчетных спектрах их находили.

Кроме того, что одна часть данных по полилокусному генотипированию домашней лошади была получена нами при использовании лиофилизированных ПЦР-наборов PCR Core («Биоком», Россия), другая — с помощью набора ПЦР-РВ («Синтол», Россия), состоящего из жидких реагентов. Генотируя одних и тех же животных с применением в ПЦР одного и того же праймера, мы регистрировали неодинаковые спектры, ха-

рактёрные для каждого из наборов (см. рис.). Причина различий заключалась в лиофилизированной Taq-полимеразе, при применении которой предпочтительно воспроизводилась более «легкая» часть спектра и происходило не только общее снижение числа локусов, но и превращение некоторых минорных фрагментов ДНК в мажорные. При добавлении в реакцию жидкой полимеразы фирмы «Синтол» или «СибЭнзим» (данные не представлены) спектр полностью восстанавливался. Очень важным представляется то обстоятельство, что точность отжига праймера, по-видимому, не играет в этом процессе определяющей роли. Подтверждением тому служит полное отсутствие в спектрах с лиофилизированной Taq-полимеразой фрагмента 877 п.н. с самыми точными сайтами отжига среди всех найденных последовательностей, при этом некоторые локусы, имеющие даже большую длину, воспроизводились стабильно (см. рис., Б).

В спектре ампликонов, полученных с лиофилизированной Taq-полимеразой, обнаруживался минорный компонент длиной примерно 310 п.н., для которого также было найдено соответствие в сиквенсах хромосом (см. табл. 2). При использовании набора ПЦР-РВ выявить этот фрагмент не удалось. В то же время с помощью набора ПЦР-РВ при повышении температуры отжига из кластера 800-900 п.н. выделялся локус размером 880 п.н., что соответствует расчетному фрагменту ДНК длиной 877 п.н., имеющему на флангах последовательности с высокой комплементарностью к праймеру (GA)₉C.

Неканонические структуры ДНК в расчетных и экспериментальных спектрах фрагментов ДНК ФИП (GA)₉C. Как отмечалось, причиной неполного совпадения расчетных и экспериментальных спектров ISSR-PCR маркеров могут быть особенности внутренней структуры анализируемых фрагментов ДНК, в частности предрасположенность к формированию неканонических вторичных структур. Само их присутствие на флангах инвертированного повтора микросателлита свидетельствует о вероятности образования шпилек, что может способствовать повышению геномной нестабильности в таких участках (4). В этой связи мы проанализировали возможности для формирования шпилек (длиной не менее 8 п.н.) и G₄ квадруплексов (структурные элементы с повышенной термоустойчивостью, образующие четырехцепочечные структуры, в которых гуанины формируют плоскость благодаря поперечным связям) внутри ампликонов (12). Рассмотрены связи между плотностью локализации таких структур в расчетных спектрах и полиморфизмом фрагментов ДНК соответствующей длины в экспериментальных спектрах у лошадей (см. табл. 5, 6).

6. Характеристика потенциальных шпилечных структур во фланкированных инвертированным повтором (GA)₉C последовательностях секвенированного генома у домашней лошади *Equus caballus*

Длина локуса, п.н.	Длина фрагмента, п.н.	Хромосома	Число шпилек внутри локуса	Доля G-C пар в возможных шпильках, %
900	900	24-я	7	25,0-2,5
800-900	876	X	9	0-50,0
800-900	871	18-я	4	25,0-100
800-900	857	3-я	1	62,5
800-900	832	6-я	4	50,0-62,5
800-900	823	19-я	2	37,5
550	637 (552)	X	5	22,2-50,0
550	572 (550)	10-я	1	37,5
500	494	1-я	1	37,5
490	489	28-я	4	37,5-75,0
380	378	11-я	1	50,0
380	377	21-я	0	—
360 (370)	364	5-я	0	—
310	309	5-я	0	—

Примечание. Представлены данные для локусов длиной до 2000 п.н., соответствующих по размеру фрагментам ДНК, амплифицированным в ISSR-PCR с последовательностью (GA)₉C в качестве праймера. Прочерки означают отсутствие таких последовательностей. Минимальное число спаренных оснований для формирования шпилек — 8.

лексов (структурные элементы с повышенной термоустойчивостью, образующие четырехцепочечные структуры, в которых гуанины формируют плоскость благодаря поперечным связям) внутри ампликонов (12). Рассмотрены связи между плотностью локализации таких структур в расчетных спектрах и полиморфизмом фрагментов ДНК соответствующей длины в экспериментальных спектрах у лошадей (см. табл. 5, 6).

Оказалось, что в последовательности длиной 877 п.н., локализованной в X-хромосоме, выявлялось 9 достаточно крупных шпилек, что больше, чем во всех остальных участках (для анализа использовали олигокалькулятор (<http://www.bio.bsu.by/molbiol/oligocalc.html>)). В последовательности длиной 871 п.н. из 18-й хромосомы обнаружили 4 потенциальные шпильки. Важно подчеркнуть, что в экспериментальных спектрах участки близкой длины выявлялись только при использовании набора ПЦР-РВ. В то же время для наиболее воспроизводимых в разных условиях ПЦР фрагментов ДНК была характерна пониженная частота таких последовательностей. Например, фрагмент длиной 380 п.н. имел всего одну шпильку, причем в наиболее близком по длине фрагменте длиной 377 п.н. (21-я хромосома) потенциальные шпильки отсутствовали. Не имела потенциальных шпилек и нуклеотидная последовательность минорного локуса длиной 310 п.н. (309 п.н., 5-я хромосома), амплифицируемого в эксперименте при использовании лиофилизированной Taq-полимеразы. Полученные данные позволяют предполагать, что предрасположенность к формированию вторичных структур может влиять на воспроизводимость фрагментов ДНК в разных условиях ПЦР.

Известно, что G_4 квадруплексы тесно связаны с возникновением двуцепочечных разрывов ДНК (DSBs) (13). Имеются данные, свидетельствующие о выраженных ассоциациях между наличием G_4 квадруплексов и двуцепочечными разрывами ДНК (DSBs) в митотических и мейотических клетках (14). В этой связи мы сопоставили частоту потенциальных G_4 квадруплексов в расчетных спектрах секвенированных нуклеотидных последовательностей, близких по длине к консервативным и полиморфным фрагментам ДНК из экспериментальных спектров ISSR-PCR маркеров (<http://bioinformatics.ramapo.edu/QGRS/index.php>). При этом выраженных различий мы не обнаружили (см. табл. 5, 6). В обеих группах G_4 квадруплексы встречались примерно с равной частотой (около 3,4 потенциального G_4 квадруплекса на 1000 п.н.). Тем не менее, один из расчетных участков, по длине наиболее близкий к высокополиморфному в экспериментальных спектрах фрагменту ДНК длиной 550 п.н., проявлял выраженную предрасположенность к формированию таких структур (см. табл. 5). Более того, в геноме человека, например, аналогичные последовательности в среднем встречаются с частотой примерно 0,125 потенциального G_4 квадруплекса на 1000 п.н. (15). В полученных нами расчетных последовательностях ампликонов ISSR-PCR спектра по праймеру $(GA)_9C$ эта цифра примерно в 27 раз больше, что может свидетельствовать о повышенной частоте локализации G_4 квадруплексов в участках генома, расположенных между инвертированными повторами микросателлитов.

Итак, у домашней лошади инвертированные повторы микросателлитных локусов, фланкирующие участки ДНК длиной до 2000 п.н. (ISSR-PCR маркеры), преимущественно сформировались в результате сложных рекомбинационных событий между мобильными генетическими элементами, принадлежащими к разным классам транспозонов. Полиморфные ампликоны ДНК, фланкированные инвертированным повтором $(GA)_9C$, которые по длине близки к обнаруженным в секвенированных геномных последовательностях, могут содержать больше участков гомологии с ретротранспозонами (в частности, с последовательностями эндогенного ретровируса III класса — ERV III), чем консервативные фрагменты. Наличие в ISSR-PCR маркере продуктов рекомбинаций с ретротранспозонами (в отличие от ДНК-транспозонов), по всей видимости, ассоциировано с по-

вышенным полиморфизмом этого геномного участка. Образование вторичных структур внутри последовательности ДНК, фланкированной инвертированным повтором микросателлита, способно повлиять на воспроизводимость полилокусного генотипирования по ISSR-PCR маркерам. В участках геномной ДНК длиной до 2000 п.н., фланкированных инвертированным повтором (GA)₉C, обнаруживается повышенная плотность нуклеотидных последовательностей, потенциально предрасположенных к формированию G₄ квадруплексов, что, вероятно, может быть обусловлено повышенной активностью рекомбинаций в этих участках.

ЛИТЕРАТУРА

1. Глазко В.И., Гладырь Е.А., Феофилов А.В., Бардуков Н.В., Глазко Т.Т. ISSR-PCR маркеры и мобильные генетические элементы в геномах сельскохозяйственных видов млекопитающих. *Сельскохозяйственная биология*, 2013, 2: 71-75 (<http://www.agrobiology.ru/2-2013glazko-eng.html>).
2. Глазко В.И., Феофилов А.В., Бардуков Н.В., Глазко Т.Т. Видоспецифичные ISSR-PCR-маркеры и пути их формирования. *Известия ТСХА*, 2012, 1: 118-125.
3. Зыбайлов Б.Л., Глазко В.И. Геномная нестабильность и неканонические структуры ДНК. *Известия ТСХА*, 2012, 5: 108-122.
4. The state of the world's animal genetic resources for food and agriculture /B. Rischkowsky, D. Pilling (eds.). FAO, Rome, 2007.
5. Феофилов А.В., Бардуков Н.В., Глазко В.И. Дифференциация генофондов алтайской и рысистых пород лошадей по ISSR-PCR маркерам. *Генетика*, 2011, 37(9): 1230-1235.
6. Caetano-Anollés G., Gresshoff P.M. Generation of sequence signatures from DNA amplification fingerprints with mini-hairpin and microsatellite primers. *Biotechniques*, 1996, 20(6): 1044-1048.
7. Caetano-Anollés G., Gresshoff P.M. DNA amplification fingerprinting using arbitrary mini-hairpin oligonucleotide primers. *Biotechnology*, 1994, 12(6): 619-623.
8. Capra J.A., Paeschke K., Singh M., Zakian V.A. G-Quadruplex DNA sequences are evolutionarily conserved and associated with distinct genomic features in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Comput. Biol.*, 2010, 6(7): 1-13.
9. Cook G.W., Konkel M.K., Major III J.D., Walker J.A., Han K., Batcher M.A. Alu pair exclusions in the human genome. *Mobile DNA*, 2011, 2: 10 (<http://www.mobilednajournal.com/content/2/1/10>).
10. Garcia-Etxebarria K., Jugo B.M. Genome-wide detection and characterization of endogenous retroviruses in *Bos taurus*. *J. Virol.*, 2010, 84: 10852-10862.
11. Greaves M., Maley C.C. Clonal evolution in cancer. *Nature*, 2012, 481(7381): 287-294.
12. Mei L., Ding X., Tsang S.-Y., Pun F.W., Ng S.K., Yang J., Zhao C., Li D., Wan W., Yu C.H., Tan T.C., Poon W.S., Leung G.K., Ng H.K., Zhang L., Xue H. AluScan: a method for genome-wide scanning of sequence and structure variations in the human genome. *BMC Genomics*, 2011, 12: 564 (<http://www.biomedcentral.com/1471-2164/12/564>, doi: 10.1186/1471-2164-12-564).
13. Sharma S. Non-B DNA secondary structures and their resolution by RecQ helicases. *Journal of Nucleic Acids*, 2011, 2011: Art. ID 724215 (doi: 10.4061/2011/724215).
14. Wade C.M., Giulotto E., Sigurdsson S., Zoli M., Gnerre S., Imsland F., Lear T.L., Adelson D.L., Bailey E., Bellone R.R., Blöcker H., Distl O., Edgar R.C., Garber M., Leeb T., Mauceli E., MacLeod J.N., Penedo M.C., Raison J.M., Sharpe T., Vogel J., Andersson L., Antczak D.F., Biagi T., Binns M.M., Chowdhary B.P., Coleman S.J., Della Valle G., Fryc S., Guérin G., Hasegawa T., Hill E.W., Jurka J., Kiialainen A., Lindgren G., Liu J., Magnani E., Mickelson J.R., Murray J., Nergadze S.G., Onofrio R., Pedroni S., Piras M.F., Raudsepp T., Rocchi M., Røed K.H., Ryder O.A., Searle S., Skow L., Swinburne J.E., Syvänen A.C., Tozaki T., Valberg S.J., Vaudin M., White J.R., Zody M.C. Genome sequence, comparative analysis, and population genetics of the domestic horse. *Science*, 2009, 326(5954): 865-867.
15. Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. Genome fingerprinting by sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 1994, 20: 176-183.

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

Поступила в редакцию
31 марта 2014 года

ISSR-PCR MARKERS AND MOBILE GENETIC ELEMENTS IN HORSE (*Equus caballus*) GENOME

N.V. Bardukov¹, A.V. Feofilov¹, T.T. Glazko^{1, 2}, V.I. Glazko^{1, 2}

¹K.A. Timiryazev Russian State Agrarian University, 49, ul. Timiryazeva, Moscow, 127550 Russia, e-mail vglazko@yahoo.com;

²Center for Experimental Embryology and Reproductive Biotechnology, str. 4, 12, ul. Kostyakova, Moscow, 127422 Russia, e-mail vglazko@yahoo.com

Received March 31, 2014

doi: 10.15389/agrobiol.2014.4.42eng

Abstract

The patterns and causes of the differences in the polymorphism of individual microsatellites, and species specificity of this variability are still not enough studied. Test systems developed by the International Association of Animal Genetics (ISAG) for genetic certification of agricultural animals, assessment of interbreed relations, the level of animal group consolidation, include a small number of genetic markers. The use of microsatellite loci fragments as PCR primers for polylocus genotyping and genome scan of agricultural animal species is more simple and effective methodical approach. We proposed a method for identifying positioning of microsatellite inverted repeat areas in genome sequences and for comparisons of this calculated areas to experimental DNA spectra amplified in PCR with the use of microsatellite loci as primers (ISSR-PCR markers). Here we report the results of the comparisons carried out for domestic horses (*Equus caballus*) of Altai breed ($n = 96$), Trotter breed ($n = 48$), Karachai breed ($n = 34$). The DNA fragments (99 sites) in the sequenced genome of the domestic horse, flanked by inverted repeat (GA)₉C, were revealed and the presence of homologous sequences to mobile genetic elements was analyzed. The nucleotide sequences were examined in the DNA fragments (expected size/obtained size) of different location: 1250-1350/1326 bp (chromosome 17), 1250-1350/1302 bp (chromosome 2), 1250-350/1296 bp (X-chromosome), 1250-1350/1287 bp (chromosome 20), 980/986 bp (chromosome 23), 800-900/900 bp (chromosome 24), 800-900/876 bp (X-chromosome), 800-900/871 bp (chromosome 18), 800-900/857 bp (chromosome 3), 800-900/832 bp (chromosome 6), 800-900/823 bp (chromosome 19), 740/739 bp (chromosome 16), 580/585 bp (chromosome 1), 550/637 bp (X-chromosome), 550/572 bp (chromosome 10), 500/494 bp (chromosome 1), 490/489 bp (chromosome 28), 380/378 bp (chromosome 11), 380/377 bp (chromosome 21), 360 (370)/364 bp (chromosome 5), 310/309 bp (chromosome 5). The PIC (polymorphic information content) values for loci were calculated. In the representatives of several breeds, the conservative and polymorphic DNA fragments were observed in the amplification product spectra obtained in the polymerase chain reaction with a primer sequence (GA)₉C. It was turned out that the polymorphous DNA fragments in different animals, in most cases, contained the homologous sequences to fragments of retrotransposons (to ERV III, particularly), while the conservative ones contained homologous sequences to DNA transposons. An increased density of nucleotide sequences, potentially prone to the G₄ quadruplex formation, was observed in the studied horse genomic DNA fragments, flanked by the inverted repeat (GA)₉C, that could be associated with an increased recombination in these areas. A secondary structure in the DNA regions flanked by a microsatellite repeat can influence the results of genotyping in case the ISSR-PCR markers are used. The data obtained suggest the relationship between the polymorphism of DNA fragments, flanked by inverted repeats of microsatellites, and a mobility of retrotransposons.

Keywords: ISSR-PCR, anonymous DNA markers, *Equus caballus*, DNA transposons, retrotransposons, noncanonical DNA structures.

Новые книги

Студенцов А.П., Шипилов В.С., Никитин В.Я. и др. **Акушерство, гинекология и биотехника репродукции животных**. М.: изд-во «КолосС», 2012, 439 с.

Рассмотрены анатомия и физиология органов размножения, способы осеменения животных, физиология и патология беременности, родов и послеродового периода. Изложены вопросы иммунологических взаимоотношений при оплодотворении и бере-

менности, взаимосвязи нервной, эндокринной и иммунной систем в регуляции гомеостаза. Даны сведения по акушерской терапии, болезням молочной железы, гинекологии домашних животных. Внесены изменения и дополнения в разделы трансплантации зародышей, физиологии размножения пушных зверей, импотенции производителей, профилактики бесплодия животных и т.д. Для студентов вузов, обучающихся по специальностям «Ветеринария» и «Зоотехния».