

УДК 575.174.015.3: 577.29

И. А. АХМЕТОЛАЕВ, И. Е. КОВАЛЕНКО, Г. А. ИСМАГУЛОВА, Н. А. АЙТХОЖИНА

## ХАРАКТЕРИСТИКА ТАНДЕМНЫХ ПОВТОРОВ СЕМИРЕЧЕНСКОГО ЛЯГУШКОЗУБА

(РГП «Институт молекулярной биологии и биохимии им. М. А. Айтхожина», г. Алматы)

Впервые проведены исследования по поиску микросателлитов различных типов в геноме семиреченского лягушкозуба *Ranodon sibiricus*. Методом вычитательной гибридизации была создана коллекция клонов, содержащих фрагменты ДНК семиреченского лягушкозуба. В результате скрининга были идентифицированы клоны, в которых присутствуют фрагменты ДНК с микросателлитными локусами. Изучение первичной структуры отобранных 63 клонов подтвердило наличие вставки и установило природу микросателлитных локусов в клонах. Выявлено, что в геноме *Ranodon sibiricus* наиболее часто встречаются тетрануклеотидные и реже динуклеотидные повторы.

Микросателлиты представляют собой tandemно-повторяющиеся элементы генома, состоящие из одного и до 6 пар оснований, способные образовывать достаточно протяженные кластеры до 60 и более повторов. Частота мутаций индивидуальных микросателлитных локусов варьирует от  $10^{-2}$  до  $10^{-4}$  событий на генерацию, что является чрезвычайно высоким показателем при сравнении с частотой мутаций в кодирующих областях генома. Обычно микросателлитные локусы имеют 5 и более аллельных вариантов и гетерозиготность выше 60%, даже при небольшой выборке [1, 2]. Все вышеперечисленные качества, в совокупности с широкой распространённостью микросателлитов по всему геному делает их наиболее привлекательными генетическими маркерами для высокоэффективного генетического картирования [3, 4]. К настоящему времени доступны микросателлитные карты практических всех генетически и экономически важных организмов, включая человека, мышь, дрозофилу, коров, овец, кур, свиней, томатов и сои. Имеются работы, посвященные микросателлитам простейших [5] и растений [6]. Однако по многим видам, включая и редкие и исчезающие виды, работ по поиску микросателлитных маркеров не было. К примеру, молекулярно-генетические исследования хвостатых амфибий семейства *Hynobiidae* носят крайне фрагментарный характер, а анализ полиморфизма микросателлитных локусов ранее в мире не проводился. В нашей работе был проведен поиск микросателлитных фрагментов в геноме семиреченского лягушкозуба, очень редкого и малоизвестного вида хвостатых амфибий, принадлежащего к семейству Углозубых (*Hynobiidae*).

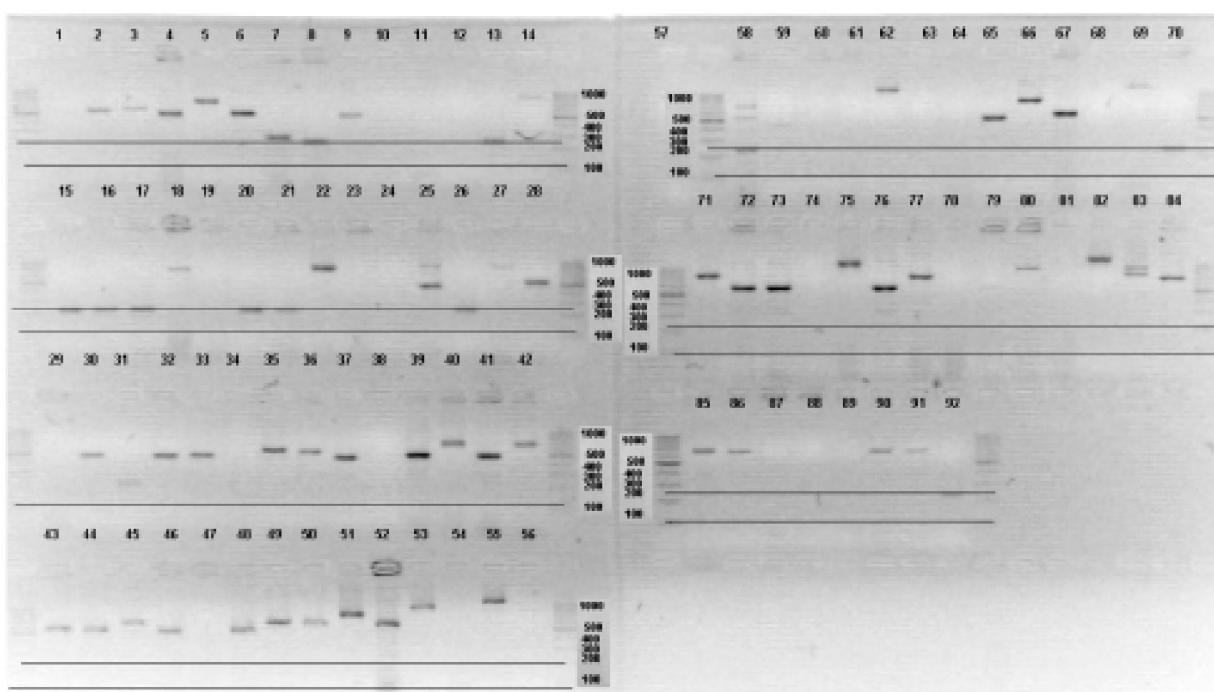
**Материалы и методы.** Вычитание микросателлитной фрагментов проводили из ДНК, выделенной из хвостовых пластинок *Ranodon sibiricus* с помощью набора для выделения ДНК из крови и тканей животных DNeasy® Blood & Tissue Kit по протоколу производителя (вставить название фирмы). Микросателлитные зонды и праймеры синтезировали на ДНК-синтезаторе ASM-800 (Biosset, Новосибирск).

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

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

Определение первичной структуры ДНК полученных клонов проводили на приборе ALFexpressII (Amersham) по протоколу производителя.

**Результаты и обсуждение.** Для поиска микросателлитных локусов посредством вычитательной гибридизации была создана коллекция клонов, содержащих фрагменты ДНК семиреченского лягушкозуба. Вычитание проводили с помощью биотинилированных зондов, состоящих из



**Рис. 1.** Результаты скрининга колоний после трансформации вектором pENTR, содержащим вычлененные фрагменты ДНК. 1-92 клонь взяты для скрининга. Маркер молекулярных весов 100b.p.

$(AG)_{12}$ ,  $(TG)_{12}$ ,  $(AAC)_6$ ,  $(AAG)_8$ ,  $(AAT)_{12}$ ,  $(ACT)_{12}$ ,  
 $(ATC)_8$ ,  $(AAAC)_6$ ,  $(AAAG)_6$ ,  $(AATC)_6$ ,  $(AATG)_6$ ,  
 $(ACAG)_6$ ,  $(ACCT)_6$ ,  $(AAAT)_8$ ,  $(AACT)_8$ ,  $(AAGT)_8$ ,  
 $(ACTC)_6$ ,  $(ACTG)_6$ .

Индивидуальные клонь, содержащие по одному фрагменту из смеси фрагментированной на короткие участки ДНК, получали в векторной системе pENTR D/TOPO. Скрининг колоний, проявившихся на чашках Петри с LB-агаром, на наличие вставки проводили амплификацией с праймеров к ДНК вируса M13. На рис. 1 представлены результаты ПЦР скрининга колоний, полученных после трансформации.

В результате скрининга были идентифицированы клонь, 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.

Для секвенирования были отобраны 63 клона. Первичную структуру ДНК отобранных клонов определяли на полуавтоматическом генетическом анализаторе ALFexpressII (Amersham). Для анализа длинных фрагментов применяли гель ReproGel Long Read.

Изучение первичной структуры отобранных клонов подтвердило наличие вставки и установило природу микросателлитных локусов в клонах. Расшифрованные нуклеотидные последовательности этих локусов были депонированы в GenBank с номерами HM196852, HM196853, HM196854, HM196855, HM196856, HM196857 и HM196858.

На рис. 2 представлены первичные структуры фрагментов ДНК клонов Rano0034, Rano0045, Rano0047, Rano0085, Rano0087, Rano0090 и Rano0093.

Молекулярно-генетическая характеристика исследованных клонов содержащих микросателлитные локусы представлена в таблице.

По полученным результатам видно, что локус HM196852 содержит тетрануклеотидный повтор TAGA, представленный четырьмя копиями в исследованном клоне. Локус HM196855 содержит сложный микросателлитный комплекс, представленный двойными повторами TCAA с вставкой последовательности TCAA. Наличие вставки TCAA возможно связано с делецией одного аденина в повторе. Сложный повторяющийся фрагмент, в котором чередуются повторы TCAA и TCAG, содержит локус HM196854. Локус HM196856 имеет последовательность

**A**

```

1 CATAAGGCATC ATTATCTGGA TTGAATTTTT TTTTCCAAAT GAAATGATAG ATAGATAGAT AATGATATGTA
GTTACCGTAG TAATAGACCT AACCTAAAAAA AAAAAGGTAA CTTACGATAC TACGATGCA TTACATACAT
71 GGTAGATGTC CAGACACAGA CAGCTTGACA TTCAAGACAGA GACAGACAGC TGACGTGCTT TGATATCTGTC
CCATCTACAG GTCTGTGCT GTGGGACTGT AGCTCTGCT CTGTCTGCTG ACTGCAACGAA ACATAGAACG
141 AAACCTGTC TTATTTCTT ATTCACTTTA CCCTTAAAGTT GTTGCACATA ATGATTACCT TCTTTTTATA
TTTGAGCAGT AATAAAGAAA TAACTAAAT GGTAATCCTA CAACGTGTAT TACTAATGGA AGGAAAATAT
211 GGCGAACCAA AATGATTCAG GGACGAGAAG CCTCATTTG TAAATTGTTA GCTAA
COGGCTTGTG TTACTAATGTC CCTGCTCTTC GGAGTAAACAC ATTTAACATT CGTTT

```

---

**B**

```

1 ACACCCACACA CACAGCACAC ATTTACACTC AGACACACAC CGCAGTACAA CACACGACA CACACTACAC
TGTGGTGTGT GTGTGCGTGTG TAAATGTGAG TCTGTGIGIG GCGTGTGTT GTGTGCTGT GTGTGATGTC
71 CACACACACAC ACACACACACA CACACACACAC CACACACAC TTCAACAAAGA GGGATTACAT
GTGIGTGTG TGTTGTGTTG TGTTGTGTTG TGTTGTGTTG TGTTGTGTTG AAGTTGTTT CCCTAAATGTA
141 CTGCTGAAAAA ACAACATTAAG GGGAAACCAAC CAAACACATG GGGG
GACGGACTTTT TGTTGTAATC CCCTTGGTTG GTTTGTGTC CGCC

```

---

**C**

```

1 CTTCAAGAAA TCCCTGAAGA CCAATATCTT TACGTGAITG CGTACTTCT CAAAGATCA GCACCAAGAA
GAAGTCTTT AGGGACTTCT GTTATAGAA ATGCACTAAC GCACTGAAGA GAACTCTAGT CGTGGTCTT
71 AGCAGTCTCT CGGGTGTGAG CTAACTAAAT GTCATCAGTC ATACATTAATC TCAATCAGTC ATACATCAGTC
TGTCAAGGA CGCCACACAC GATATATTTC CAGTACTGTC TAACTAAATC ATAGTGTGAGT TAACTCAGTC
141 TCACTCAGTC ATACATCAG TCATOGCTA GCTTCATTT GTGTTCTTG ACAGTGTGTC GCAATTGTC
ATGCTGTTAG TTAGTTAGC AGTTAGCGAT CGGAAGTAAAC CAAAGAAAAC TGTCAACACA CGTAAAACAG
211 ATGTTGAAAAG AGGGAG
TACAACTTT TCCCTC

```

---

**Г**

```

1 ACCGTCATCG ACAAGTAGCG CTTAGACGCA AATCAATGAT TGTATTTGG CGCTTAACAA ATCCACCAAT
TCCAGTAGC TGTTCTCCTC GAAATCTGCTT TTAGTTACTA AGCATTAACCC CGGAAATTGTT TAGTTGTTA
71 CAAATCAGTC AAATGAAAC AATCTGCCCC TATACGAAAGG GGTGTTGAAAG CCTCAGCCCC AAGAAAGTTG
TTTAACTTAAAG TTAGACGGGGG ATATGCTTCC CGAGGACTTC GGAGTCGGGC TTCTTCRAAC
141 ACTGACCGCC TGGGAGAGCG GGAAG
TGACTGGCGG ACCCTTCTGC CCTTC

```

---

**Д**

```

1 ATCCAAACAG CCAGAGATAG TTGACATACA CACACAGACA ATAGACAGAC CGGGACAGT ATSCATCAGA
TAGTTTGTCTG GGTCTCTATC AACTGTATGT GTGTGTCTGT TATCTGTCTG TCCCTTGTC TAACTGATCT
71 CACATCAGTC AACACAGACA CACACAGACA CAGAGAGTAT ACCAACACAC ACACGGACAC AGAACACAGT
GTGTGTGTC TAACTGATCTGT GTCTCTCTA TGGTTGTG TGTTGCTGTG TCTTGTGTC
141 GACACA
CTGTGT

```

---

**Е**

```

1 TACCTACAGT CTTGAGAAGC TGGACAGTC TGTATTGATT GATTGTTGAA TTGATTTTG ATTTTCACAT
ATGGATGTC GAACTCTCG ACGTGTCACT TAACTAACTAA CAAACTAAAC AATCAATGTA
71 GGCACCACTA TGCACTCAGG TAGAGTGTGCG CTAAGAGTCG TGAAACGATG CGGGACCCGA TCAATCTG
CGTGTTGAT ACGTGAGTGC ATCTCACACG GATTCTCAGG ACTTGCTATC GACCTGGGCT AGTTAGAACT
141 AGAAAGGGAG GAAAGAGGGG AAAAGAGAGA TGAAAGAGATA AGAGGTGAAAG AGAAAAGCTA GTATTAGGT
TCTTTCCTTC CTTTCTCCCTC ACTTTCTAT TCTCCACTT TCTTGTGAT CAAATTCCTA
211 AGG
TCC

```

---

**Ж**

```

1 CTGTGTGCAC CACAAATGAT TTGTCTGTGT GTTTAAATG TGTGTGTG TGTGTGTG TGTGTGTG TGTGTGTG
GACACACGTG GTGTTACATA AACACACACA CAAATTTAC ACACACACAC ATACACACAC AGATACACAG
71 TGTGTGTG AGTGTGTGTG TGTGTGTGCC TGTGTGTG TGTGTGTG
ACAGACACAC ACACACACAC ACAGACACGG AGACACACAC ACACACACA

```

**Рис. 2.** Первичная структура фрагмента ДНК клонов Rano0034, Rano0045, Rano0047, Rano0085, Rano0087, Rano0090 и Rano0093 (HM196852, HM196853, HM196854, HM196855, HM196856, HM196857 и HM196858)

## Характеристика исследованных клонов

Клон	Номер в базе данных GenBank	Размер вставки (п.н.)	Микросателлит
Rano0034	HM196852	265	(TAGA) <sub>4</sub>
Rano0045	HM196853	184	(CCACACACACA) <sub>5</sub>
Rano0047	HM196854	226	(TCAA) <sub>2</sub> TTAA(TCAA) <sub>4</sub> (TCAG) <sub>2</sub> (TCAA) <sub>4</sub>
Rano0085	HM196855	165	(TCAAA) <sub>2</sub> TCAA(TCAAA) <sub>2</sub> TCAA
Rano0087	HM196856	146	(ACACAG) <sub>3</sub>
Rano0090	HM196857	218	(TTGA) <sub>6</sub>
Rano0093	HM196858	118	(TG) <sub>6</sub> TA(TG) <sub>4</sub>

ACACAG, которая в исследованном образце повторяется три раза. Тетрануклеотидный повтор TTGA идентифицирован в локусе HM196857 и представлен шестью копиями на локусе. Динуклеотидный повтор TG в локусе HM196858 представлен десятью копиями. В локусе HM196853 идентифицирован повтор, который, с одной стороны, является минисателлитом CCACACACACA представленный тремя копиями в локусе, с другой стороны, локус HM196853 содержит динуклеотидный повтор AC с вставками цитозина через каждые четыре повтора.

Таким образом, первые работы по поиску микросателлитов различных типов в геноме *R.sibiricus*, показало что, наиболее часто в геноме этого вида встречаются тетрануклеотидные повторы и реже динуклеотидные повторы. Среди тетрануклеотидных повторов наиболее часто в геноме большинства эукариот встречается (TCAA)<sub>n</sub> – повтор, затем (GATA)<sub>n</sub>, (TAGA)<sub>n</sub> [7]. Полученные нами данные соответствуют имеющимся сведениям о содержании микросателлитов в геномах других эукариотических организмов. По результатам анализа первичной структуры ДНК исследованных клонов будут получены праймеры, фланкирующие микросателлитные повторы, которые будут использованы в генотипировании различных популяций семиреченского лягушкозуба Жетысуйского Алатау.

## ЛИТЕРАТУРА

- Bowcock A.M., Linares A.R., Tomshorde X, Minch E., Kidd J.R., Cavalli-Sforza L.L. High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites // Nature. 1994. 368. P. 455-457.
- Deka R., Jin L., Shriver M.D., Yu L.M., Decroo S., Hundrieser J., Bunker C.H., Ferrell R.E., Chakraborty R. Population genetics of dinucleotide (dC-dA)<sub>n</sub>-(dG-dT)<sub>n</sub> polymorphisms in world populations // Am. J. Hum. Genet. 1995. V. 56. P. 461-474.

3. Dib C, Faure S., Fizames C, Samson D., Drouot N., Vigнал A., Millasseau P., Marc S., Hazan J., Seboun E., Lathrop M., Gyapay G., Morissette J., Weissenbach J. A comprehensive genetic map of human genome based on 5,264 microsatellites // Nature. 1996. V. 380. P. 152-154.

4. Dietrich W.F., Miller J., Steen R., Merchant M.A., Damronboles D., Husain Z., Dredge R., Daly M.J., Ingalls K.A., OXonnor T.J., Evans C.A., DeAngelis M.M., Levinson D.M., Kruglyak L., Goodman R., Copeland N.G., Jenkins N.A., Hawkins T.L., Stein L., Page D.C., Lander E.S. A comprehensive genetic map of mouse genome // Nature. 1996. V. 380. P. 149-152.

5. Su X.Z., Willems T.E. Toward a high-resolution *Plasmodiumfalciparum* linkage map - polymorphic markers from hundreds of simple sequence repeats // Genomics. 1996. V. 33. P. 431-444.

6. Causse M.A., Fulton T.M., Cho Y.G., Ahn S.N., Chuwongse J., Wu K.S., Xiao J.H., Yu Z.H., Ronald P.C., Harrington S.E., Second G., McCouch S.R., Tanksley S.D. Saturated molecular map of the rice genome based on an interspecific backcross population // Genetics. 1994. V. 138. P. 1251-1274.

7. Ellegren H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution // Genetics. 2004. V. 5. P. 435-445.

## Резюме

Алғашқы рет *Ranodon sibiricus* жетисү бакатісінің геномындағы әртүрлі типтегі микросателлиттерді іздеу бойынша зерттеу жұмысы жүргізілді. Есептеу арқылы будандастыру әдісі бойынша жетисү бақатісінің ДНК жолақтары бар клондарының коллекциясы құрылды. Скрининг зерттеу нәтижесінде 200 артық жұп негізделген, вектор және ДНК жолақтары бар клондар жекешелендірілді. Иріктең алынған алғашқы 63 клонның құрылымын зерттеу нәтижесінде, клондардағы микросателлитті локустардың табигаты анықталды. *Ranodon sibiricus* геномында тетрануклеотидтер жиі ал, динуклеотидтер қайталауда аз кездесетін анықталды.

## Summary

For the first time the search for different types of microsatellite regions in *Ranodon sibiricus* genome was performed. Libraries of *Ranodon sibiricus* DNA regions were created by subtractive hybridization. Screening resulted in clones that contain a vector and a microsatellite locus exceeding 200bp. Selected 63 clones that confirmed to have insertion were characterized for their microsatellite loci. Our study demonstrated that *Ranodon sibiricus* genome contain tetranucleotide repeats more frequently than dinucleotide's.