БИОЛОГИЯ

УДК 597.442:575

ПЕРСПЕКТИВЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ПАСПОРТИЗАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ ОСЕТРОВЫХ РЫБ

© 2003 г. Н.В. Войнова, А.Б. Брень, Д.И. Водолажский, В.А. Чистяков, И.В. Корниенко

The data on mitotypes distribution of the Russian sturgeon of the Azov pool are given. It is shown polimorphism of mtDNA control region is defined by presence of transition, transversion and tandem repetitions of length on 82 bp. It is established that alongside with a D-loop the cytochrome b locus also is polymorphic.

Осетровые рыбы – уникальное творение природы. Благодаря своей удивительной жизнестойкости, способности приспосабливаться и выживать при любых природных катаклизмах (которые сопровождали их на протяжении всей истории существования начиная с палеозоя), осетровые сохранились до наших дней.

В последние десятилетия произошло резкое падение запасов этих уникальных рыб. К настоящему времени в ряде водоемов Азово-Черноморского бассейна до 90 % популяций осетровых составляют рыбы от промышленного воспроизводства, и альтернативы ему на сегодняшний день нет. Перед учеными и рыбоводами в качестве первоочередной стоит сложная задача по формированию маточных стад и созданию реального резерва для работы рыбоводных заводов.

Переход к использованию маточных стад, помимо стабилизации ситуации со снабжением заводов производителями, означает резкое уменьшение числа участвующих в воспроизводстве генотипов. Чтобы в сложившейся ситуации сохранить и стабилизировать популяции осетровых, необходимо применение более совершенных и современных способов мониторинга генетических процессов, протекающих в искусственно воспроизводимых популяциях, а также отбора производителей. Речь идет прежде всего о молекулярной генетике и паспортизации всех производителей, которые участвуют в процессе искусственного воспроизводства. Для решения этих задач три года назад во ВНИРО была создана Всероссийская генетическая коллекция ДНК осетровых рыб, филиал которой функционирует на базе АзНИИРХа.

Известно, что геном осетровых состоит из митохондриальной и ядерной ДНК. Теоретически для генетической паспортизации желательно использовать как цитоплазматические, так и ядерные маркеры. Наиболее доступна для исследований митохондриальная (мт) ДНК в силу того, что она лучше сохраняется в тканях, а также ископаемых образцах и не столь сложно организована по сравнению с ядерной ДНК [1]. Кроме того, по данным литературы, возможно использование мтДНК для видовой идентификации особей [2–5]. Чаще всего в этих целях используют наиболее изученные для осетровых регионы D-петли и цитохрома *b*. Анализ этих последовательностей послужил основой наших исследований мт-маркеров азовской популяции русского осетра.

Другое направление генетической паспортизации основано на технике так называемой геномной дактилоскопии. Использование специальных методических приемов позволяет без определения конкретной последовательности ДНК получить индивидуальный для каждой особи электрофоретический спектр.

Один из таких методов – RAPD-PCR (полимеразная цепная реакция (ПЦР) со случайными праймерами) успешно применяется группой В.А. Барминцева в Центре молекулярно-генетической идентификации (ВНИРО) для изучения генома русского осетра [6]. Подобраны специальные праймеры, позволяющие получать индивидуальные для каждой особи электрофоретические спектры. Нами совместно с группой Барминцева проведены эксперименты по RAPD- PCR-анализу азовской популяции русского осетра. Перспективы использования этой методологии для паспортизации производителей обсуждаются в данной работе.

Экспериментальная часть

В качестве одного из мт-маркеров азовской популяции русского осетра в работе были проанализированы последовательности D-петли мтДНК русского осетра *Acipenser gueldenstaedti*. Материалом для этого послужили мягкие ткани от 28 особей, выловленных в Азовском море на контрольно-наблюдательных пунктах и отобранных на рыбоводных заводах в 1997–1999 гг. сотрудниками АзНИИРХа.

В качестве биологического материала для типирования участка цитохрома *b* использовали неоплодотворенную икру, полученную от 24-х самок русского осетра, взятых в качестве производителей на Донском (номера выделены жирным шрифтом) и Рогожкинском осетровых рыбоводных заводах (ОРЗ). Номера особей соответствуют номерам образцов в каталоге коллекции генетических материалов АзНИИРХа, имеющей статус филиала «Национальной генетической коллекции ДНК-содержащих образцов осетровых рыб»: **538, 539, 540, 541, 542, 543, 544, 545, 546,**

556, 600, 601, 602, 603, 604, 605, 606, 607, 608, 609, 610, 611, 612, 613.

Образцы мягких тканей и икры массой 0,5 – 1 г фиксировали 96 %-м этанолом и в течение суток доставляли в лабораторию, где после смены этанола хранили при 70 °С.

Нуклеиновые кислоты выделяли при помощи стандартного метода органической экстракции [7].

Энзиматическую амплификацию участков D-петли и цитохрома *b* мтДНК, основанную ПЦР, проводили с использованием соответствующих праймеров, структура которых была подобрана на основании данных EMBL GenBank (табл. 1). Предварительные эксперименты подтвердили специфичность этих праймеров для осетровых рыб.

Таблица 1

Структура использованных праймеров

Амплифицируемый участок	Наименование праймера	Структура олигонуклеотида 5'→ 3'
D-петля	Прямой L_{OS1}	ACCCTTAACTCCCAAAGCTAA
	Обратный H_{OS2}	CATTTAATGGTAGATGAAACATT
Цитохром *b*	Прямой Fb	CTCCTAGGCCTCTGCCTTGT
	Обратный Rb	GAGAAAGGGGTCGGAACGTG

Продукты первой амплификации очищали от избытка дезоксинуклеотидтрифосфатов и праймеров с помощью препаративного электрофореза в легкоплавкой агарозе [8]. Секвенирование амплифицированных участков мтДНК проводили методом терминации полинуклеотидной цепи [9] с использованием флюоресцентномеченых дидезоксинуклеотидтрифосфатов.

Разделение амплифицированных фрагментов мтДНК проводили в 4 %-м полиакриламидном денатурирующем геле на автоматическом секвенаторе при постоянном напряжении 1600 В и температуре геля +50 °С в течение 9 ч. В качестве референтной последовательности использовали первичные последовательности генов D-петли и цитохрома *b*, представленные Ludwig et al. (2000, EMBL GenBank, AJ245826).

Результаты и обсуждение

Для установления специфичности подобранных праймеров проводили ПЦР с тотальной ДНК русского осетра и с тотальной ДНК человека из набора «Control human DNA1 (PE Biosystems)», «Control human DNA2 (PE Biosystems)», «Control human DNA (Promega)». Тесты продемонстрировали высокую степень специфичности праймеров L_{os1} и H_{os2}, использованных в данной работе, к ДНК русского осетра.

Кроме того, предварительные эксперименты позволили установить полное совпадение параметров проведения ПЦР с теоретическими расчетами по температуре отжига для данных праймеров (+58 °С), что свидетельствовало о высокой специфичности образования ПЦР-продуктов.

ПЦР-амплификация региона D-петли мт ДНК показала наличие гетероплазмии длины у всех исследованных особей азовской популяции русского осетра. Были установлены три основные группы ПЦР-продуктов.

Различия по молекулярной массе (длина ПЦР-продуктов) наблюдаются в основном между пробами от различных особей (интериндивидуальная гетероплазмия).

Анализ первичной структуры показал, что исследуемый участок D-петли мтДНК является полиморфным регионом. По длине амплифицированного участка ПЦР-продукты распределились следующим образом: 7 проб из 28 имели длину, равную 242 парам оснований; 7 проб – 324 парам оснований; 14 проб – 406 парам оснований. Различия в длине ПЦР-продуктов фрагмента D-петли мт ДНК определяются наличием тандемных повторов длиной 82 пар нуклеотидов (п.н.) Все повторы имели идентичную последовательность за исключением нескольких транзиций Т > Ц у различных особей.

Анализ нуклеотидных замен и длины ПЦР-продуктов позволил выявить 8 митотипов. Первичные последовательности всех митотипов представлены в EMBL GenBank (регистрационные номера AJ295060–AJ295067).

Анализ первичной структуры гена цитохрома *b* показал, что исследуемый участок также является полиморфным регионом. Однако изменчивость в нем не определяется наличием повторов, а является результатом точечных мутаций. У 24 особей русского осетра было обнаружено восемь митотипов, четыре из которых уникальны. Участок длиной 300 п.н. содержал восемь полиморфных позиций. Наиболее часто встречался митотип с точечными заменами в 192-м (G/A) и 260-м (T/C) положениях (в сравнении с референтной последовательностью EMBL GenBank AJ245826).

Полиморфизм исследованного участка цитохрома *b* представлен в основном транзициями T-C и A-G (табл. 2). Такой тип замен, как правило, характерен для мутаций, вызванных кислородными радикалами, генерируемыми в процессе клеточного дыхания как побочные продукты [10]. Анализ всех обнаруженных мутаций показал, что замены только в 3-х позициях приводят к аминокислотным заменам в молекуле белка. Так, транзиция G на A в 70-м положении приводит к замене валина на изолейцин; транзиция T на C в 256-й позиции – к замене фенилаланина на лейцин; а T на C в 260-м положении – к замене валина на аланин.

Таблица 2

Распределение точечных замен в исследованном регионе гена цитохрома *b* мтДНК азовской популяции русского осетра

Тип мутаций	Число позиций, где имели место мутации	Общее число мутаций
C-T	1	1
T-C	4	7
A-G	1	1
G-A	2	7
Всего	8	16

Прежде всего необходимо отметить, что обе изученные последовательности ДНК являются полиморфными, что собственно и делает их пригодными для генетической паспортизации. Количественные и качественные характеристики, полученные нами для D-петли, соответствуют результатам работы [11] для каспийской популяции.

При изучении первичной структуры гена цитохрома *b* нескольких десятков особей каспийской популяции русского осетра было обнаружено всего 4 митотипа [11], три из которых представлены в EMBL GenBank (AJ245826, AJ249692 и AJ245827). Существование восьми митотипов гена цитохрома *b* в исследованной нами выборке может свидетельствовать либо о большем генетическом разнообразии *A. gueldenstaedtii* азовской популяции по сравнению с каспийской, *либо о наличии артефактов, связанных с* отбором родственных особей [11]. При этом необходимо иметь в виду, что при иследовании большей выборки число митотипов азовской популяции может быть скорректировано в сторону увеличения.

Существование у русского осетра высокого внутривидового полиморфизма по последовательностям цитохрома *b* отмечено и в [5]. Это явление делает затруднительной, а зачастую и невозможной видовую идентификацию осетровых по последовательностям мтДНК, однако дает ценный материал для анализа генетических процессов в популяциях этих рыб. Большинство мутаций, обнаруженных в гене цитохрома *b*, не приводит к заменам в последовательности аминокислот, смысловые замены ограничены аминокислотами с алифатическими радикалами и также, по-видимому, нейтральны. Нейтральность маркеров является одним из необходимых условий корректности многих популяционно-генетических интерпретаций, в частности определения генетических расстояний. В этой связи обращает на себя внимание существование «массовых» и «редких» митотипов. Очевидно, «массовые» митотипы 1 и 2, которые характерны для 65 % особей, являются более древними – исходными. Можно достаточно уверенно предположить происхождение пятого митотипа из второго и седьмого – из первого.

«Редкие» митотипы, особенно несущие несколько мутаций, могут быть перспективными для идентификации потомства отдельных производителей, как минимум, среди молоди, выращенной на Рогожкинском и Донском ОРЗ. Если исследование других последовательностей мтДНК особей с «редкими» митотипами подтвердит их редкую встречаемость, то после необходимой доработки, связанной с привлечением данных ДНК-фингерпринтинга, мы сможем получить уникальный «инструмент» для объективной оценки промвозврата молоди русского осетра, полученной на вышеназванных осетровых заводах в 2001 г.

Кроме того, установление факта различий в структуре мт-генома отдельных особей русского осетра может лечь в основу молекулярно-генетической технологии подбора производителей, что, несомненно, имеет важное практическое значение. Следует подчеркнуть, что это только первые работы в этом направлении, и их необходимо дополнить результатами по исследованию других областей мтДНК. Анализ сцепленных изменений в различных участках мтДНК в совокупности с характеристикой ядерного генома позволят проводить молекулярно-генетическую паспортизацию производителей осетровых. Как уже упоминалось выше, нами совместно с лабораторией В.А. Барминцева был проведен RAPD-анализ ДНК, выделенной из образцов тканей 18 производителей русского осетра, использованных в 2001 г. на Донском ОРЗ.

Полученный нами материал был обработан в Центре молекулярно-генетической идентификации (ВНИРО) по стандартной методике [6]. В результате электрофоретического разделения продуктов ПЦР (ампликонов) в 6 % ПААГ были получены RAPD-спектры, которые считывали непосредственно с дефинитивных гелей на приборе «Typhoon 8600» (Variable Mode Imager, «Molecular Dynamics», USA).

Результаты RAPD-анализа подтвердили высокую специфичность метода для особей азовской популяции русского осетра. Данный метод позволяет получить для каждой особи электрофореграмму ампликонов с выраженными индивидуальными полосами. Полученные данные позволили оценить генетические расстояния между всеми парами, образованными из 8 самцов и 10 самок, участвовавшими в скрещивании. Статистический анализ показал, что коэффициент попарного сходства, рассчитанный по стандартной методике [12], подчиняется распределению, близкому к нормальному, с достоверной отрицательной асимметрией. Исключая какие-либо пары, либо добавляя сперму и икру в общий пул, можно сдвигать характеристики распределения, тем самым управляя генетическим разнообразием потомства.

Хотя научная достоверность полученных результатов достаточно хорошо статистически подтверждена, их внедрение в практику требует более широкого и продолжительного мониторинга, и в этом плане результаты являются предварительными. Однако они ясно показывают, что RAPD-PCR-анализ может послужить важным инструментом мониторинга генетического разнообразия популяций осетровых рыб.

Таким образом, полученные нами индивидуальные характеристики ядерного и мт-генома русского осетра азовской популяции в будущем могут быть использо-

ваны для получения индивидуальных генетических паспортов производителей. Результаты первых работ вселяют надежду на возможность решения этих задач.

В заключение хотелось бы подчеркнуть, что одной из основных предпосылок получения адекватных результатов при проведении геномных исследований на осетровых рыбах, обитающих в Российских водоемах, является использование квалифицированно отобранных образцов, официально зарегистрированных в «Национальной генетической коллекции ДНК-содержащих образцов осетровых рыб», созданной на базе ВНИРО.

Литература

1. *Parsons T.J., Coble M.D.* // Croat. Med. J. 2001. Vol. 42. P. 304–314.
2. *Bär W. et al.* // Int. J. Legal. Med. 2000. Vol. 113. P. 193–196.
3. *Morley J.M. et al.* // Int. J. Legal Med. 1999. Vol. 112. P. 241–248.
4. *Pourkazemi M. et al.* // J. Appl. Ichtyol. 1999. Vol.15. P. 23–28.
5. *Birstein V. et al.* // Conservation genetics. 2000. Vol. 1. P. 81–88.
6. *Recoubratsky A. V. et al.* // 4th International symposium on sturgeon. USA. 2001.
7. *Schneider P. M.* Methods in Molecular Biology. Totowa; NJ, 1998.
8. *Leonard J. T. et al.* // Biotechniques. 1998. Vol. 24. P. 314–317.
9. *Sanger F. et al.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1977. Vol. 74. P. 5463 – 5467.
10. *Marnett L. J.* // Carcinogenesis. 2000. Vol. 21. P. 361–370.
11. *Ludwig A., May B. et al.* Genetics. 2000. Vol. 156. P. 1933–1947.
12. *Токарская О.Н. и др.* // Генетика. 2000. Т. 36. № 11. С. 1520 – 1530.

Азовский НИИ рыбного хозяйства, Ростовский государственный университет *6 мая 2002 г.*

УДК 575.174:599.9

ЛОКАЛИЗАЦИЯ И ЧАСТОТА ПОЛИМОРФНЫХ ПОЗИЦИЙ В ГИПЕРВАРИАБЕЛЬНОМ РЕГИОНЕ 2 (73-340) МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК

© 2003 г. И.В. Корниенко, Ю.К. Гаврилей, С.И. Браславская, Г.В. Афанасьева, Е.В. Щербакова, Л.С. Михалкович, П.Л. Иванов

In work the data on polymorphic sites of hypervariable region 2 (HV2) (73-340) of mitochondrial DNA (mtDNA) of 157 Russian slavs are given. At analysis of sequences of fragments of a locus HV2 it is revealed 74 mitotypes 49 of which were unique. Ten polymorphic positions on a field of 73–320 control regions of mtDNA of the slavs identified. The greatest number of mutations is localized in positions 73, 152, 195, 263, 309.1 and 315.1.

Нуклеотидная последовательность митохондриальной ДНК (мтДНК) практически идентична для матрилинейных родственников. Это обстоятельство используется в популяционной генетике, антропологических исследования, а также в судебной медицине для доказательства идентичности или отличия исследуемого генетического материала от образцов, взятых у заведомо известных матрилинейных родственников. Для анализа кровного родства, как правило, исследуют не всю молекулу мтДНК, а только ту ее часть, которая обладает наибольшим полиморфизмом [1]. Этот высокополиморфный участок мтДНК, называемый D-петлей, составляет не более 7 % от всего митохондриального генома (мтГ) человека. Тем не менее именно в нем сосредоточен наибольший массив индивидуализирующих признаков.

МтДНК человека представляет собой двухцепочечную кольцевую молекулу размером 16569 нуклеотидных пар (н.п.), первичная структура которой была расшифрована в 1981 г. [2]. Анализ первичной структуры мтДНК человека показал, что мтГ очень компактно организован и имеет единственную некодирующую область (контрольный регион), размером 1122 н.п., расположенную между генами, кодирующими транспортные РНК пролина и фенилаланина. В этой некодирующей области расположены регуляторы репликации и транскрипции мтДНК [3]. Несмотря на большую функциональную значимость, в некодирующем регионе накапливается большое число мутаций, что делает его высокополиморфным по сравнению с другими участками мтДНК [4].

Вследствие высокой копийности мтГ, а также строгое наследование по материнской линии обусловило использование маркеров мтДНК в судебной медицине [5], антропологии [6], археологии [7] и популяционной генетике [8].

С использованием методов секвенирования нуклеотидных последовательностей гипервариабельных сегментов контрольного региона D-петли мтДНК к настоящему времени накоплены многочисленные данные о вариабельности этих участков в различных этнических группах [9 – 13]. В литературе практически отсутствует информация о разнообразии гипервариабельного участка 2 (HV2) среди славян.

В настоящей работе мы изучили полиморфизм гипервариабельного сегмента 2 D-петли мтДНК среди славян из различных регионов Российской Федерации.