

**Главный редактор В.
В. М О Р Г У Н**

Редакционная коллегия

В.С. КРАВЕЦ (зам. главного редактора), Т.В. ЧУГУНКОВА (зам. главного редактора), В.И. ГЛАЗКО, Ю.Ю. ГЛЕБА, Э.А. ГОЛОВКО, И.А. ГРИГОРЮК, Д.М. ГРОДЗИНСКИЙ, И.Н. ГУДКОВ, Б.И. ГУЛЯЕВ, Д.А. КИРИЗИЙ, С.С. КОСТЫШИН, С.М. КОЧУБЕЙ, В.В. КУЗНЕЦОВ, М.В. КУЧУК, Е.А. ЛАРЧЕНКО, Н.Н. МУСИЕНКО, В.И. НИКОЛАЙЧУК, В.Ф. ПАТЫКА, В.Н. РЕШЕТНИКОВ, Е.С. ТКАЧУК, С.И. ТОМА, В.К. ЯВОРСКАЯ

Ответственный секретарь Г.И. ДРУЖИНА

Адрес редакции
03022 Киев 22, ул. Васильковская, 31/17
Институт физиологии растений и генетики НАН Украины
Телефон (044) 263 01 14, E-mail: editor@ifrg.freenet.kiev.ua

Editor-in-Chief
V. V. M O R G U N

Editorial Board

V.S. KRAVETS (Vice Editor-in-Chief), T.V. CHUGUNKOVA (Vice Editor-in-Chief), V.I. GLAZKO, Yu.Yu. GLEBA, E.A. GOLOVKO, I.P. GRIGORYUK, D.M. GRODZINSKY, I.M. GUDKOV, B.I. GULYAEV, D.A. KIRIZIY, S.M. KOCHUBEI, S.S. KOSTISHIN, M.V. KUCHUK, V.V. KUZNETSOV, K.A. LARCHENKO, M.M. MUSIENKO, V.I. NIKOLAYCHUK, V.P. PATYKA, V.M. RESHETNIKOV, K.S. TKACHUK, S.I. TOMA, V.K. JAVORSKA

Executive Secretary G.I. DRUZHINA

Address of Editorial Office
03022 Kyiv 22, 31/17 Vasylkivska St., Ukraine
Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine
tel: (044) 263 01 14, E-mail: editor@ifrg.freenet.kiev.ua

Научный редактор *Д.А.Киризий*
Редактор *М.Н.Гусарь*
Художественный редактор *Т.М.Немеровская*
Компьютерный набор *З.Л.Насад* Компьютерная
верстка *Г.М.Ледяевой*

Свидетельство о регистрации КВ №2396 от 04.02.97 г.

Подп. в печ. 20.07.2002. Формат 70x108/16. Бум. офс. Гарнитура типа "Датч".
Усл. печ. л. 8,05. Усл. кр.-отт. 8,6. Уч.-изд. л. 9,4. Тираж 300. Заказ № 624.

Оригинал-макет изготовлен в редакции журнала. Издательство "Логос".
01030 Киев 30, ул. Б. Хмельницкого, 10. © Институт физиологии
растений и генетики НАН Украины, 2002

УДК 577.2:595.773.4

ТИПЫ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

Р.Н. КАЛЕНДАРЬ,^{1,2} В.И. ГЛАЗКО²

¹Институт биотехнологии, Хельсинский университет
Биоцентр, 1, Р.О. Бокс, 56, Виикинкаари, 6, Фин-00014, Хельсинки, Финляндия

²Институт агроэкологии и биотехнологии Украинской академии аграрных наук
03143 Киев, ул. Метрологическая, 12

Рассматриваются различные типы молекулярно-генетических маркеров полиморфизма участков ДНК, их преимущества и недостатки, а также спектры задач, решаемых с их помощью. Особое внимание уделяется методам выявления полиморфизма с использованием последовательностей ретротранспозонов. Они составляют основную часть геномной ДНК эукариот и выявляются во всех хромосомах. Эти методы являются развитием известных методов - RAPD, ISSR и AFLP. Методы IRAP и REMAP позволили упростить исследования и сделать ретротранспозоны реальными инструментами в генетическом анализе. Показано, что методы, основанные на анализе последовательностей, несущих ретротранспозоны, являются эффективными инструментами в исследовании генетического полиморфизма растений и животных.

Ключевые слова: полиморфизм, фингерпринт, белки, RFLP, RAPD, ISSR, AFLP, ретротранспозоны, SSAP, IRAP, REMAP, RBIP.

Основные задачи в исследованиях полигенной основы реализации хозяйственно-ценных признаков сельскохозяйственных растений и животных связаны с необходимостью подбора оптимальных типов молекулярно-генетических маркеров (МГМ): 1) для идентификации сортов растений и пород животных; 2) для оценки их генеалогических связей; 3) для поиска МГМ, ассоциированных с желательными признаками, которые подвергаются воздействию факторов искусственного и естественного отбора.

Преимущество классических методов анализа фенотипического разнообразия состоит в том, что они основаны на прямой оценке признаков, важных для селекционера [7-10]. Их сложно улучшить или заменить экспресс-методами. Однако большинство хозяйственно-ценных признаков остаются недостаточно исследованными в отношении генов, детерминирующих их развитие. Для этой цели широко используются методы молекулярной генетики.

Теоретическое обоснование применения генетических маркеров в селекции дал Серебровский в 20-х годах XX ст. Открытие значительного полиморфизма макромолекул, и в первую очередь белков, привело к возникновению качественно новых возможностей для изучения генетических процессов в природных популяциях и решения на новом уровне ряда задач животноводства, семеноводства и селекции [3, 7, 8].

За последние годы накопилось большое количество данных об эффективности использования МГМ на уровне как белков, так и ДНК, РНК, для решения многих задач генетики, селекции, сохранения биологического разнообразия, изучения механизмов эволюции, картирования хромосом, а также для семеноводства и племенного дела [13-17, 20, 39]. Несомненно, в решении этих задач важная роль принадлежит МГМ. Используемые маркеры должны обладать определенными свойствами и отвечать ряду требований:

1) доступность фенотипических проявлений аллельных вариантов для идентификации у разных особей; 2) отличимость аллельных замещений в одном локусе от таковых в других локусах; 3) доступность существенной части аллельных замещений в каждом изучаемом локусе для идентификации; 4) изучаемые локусы должны представлять случайную выборку генов в отношении их физиологических эффектов и степени изменчивости; 5) равномерность распределения по локализации в геноме; 6) легкая выявляемость, воспроизводимость и дешевизна; 7) возможность автоматизации выявления; 8) относительная нейтральность [7, 8, 19, 46, 47].

Очевидно, что не существует такого стандартного набора маркеров, который отвечал бы всем этим требованиям. Как правило, наиболее широко для описания генофондов используют: а) полиморфизм белков, в частности электрофоретические варианты белков или изоферментов [7-9, 12, 31]; б) ДНК-полиморфизм, выявляемый с помощью гибридизации по Саузерну (ПДРФ) или с помощью полимеразной цепной реакции — ПЦР (ПЦР микросателлитных локусов — SSRP и ПЦР анонимных последовательностей ДНК — RAPD, ISSR, AFLP).

Наиболее используемые МГМ условно можно подразделить на следующие типы: маркеры участков структурных генов, кодирующих аминокислотные последовательности белков (электрофоретические варианты белков); маркеры некодирующих участков структурных генов; маркеры различных последовательностей ДНК, отношение которых к структурным генам, как правило, неизвестно — распределение коротких повторов по геному (RAPD, Randomly Amplified Polymorphic DNA — случайно амплифицируемая полиморфная ДНК; ISSR — инвертированные повторы; AFLP — полиморфизм в сайтах рестрикции) и микросателлитные локусы (тандемные повторы с длиной элементарной единицы в 2—6 нуклеотидов).

Следует отметить, что для идентификации, описания и использования количественных признаков необходима информация об ассоциациях генов на внутри- и межлокусных уровнях. Это существенное усложнение, поскольку количество возможных генотипов растет экспоненциально с количеством исследуемых локусов и количеством аллелей на локус. Следствием является необходимость проведения большого количества циклов сегрегации и рекомбинаций и исследования популяций достаточно большого размера для целенаправленного формирования разных по продуктивности генотипов.

Более того, требуется трудоемкий по временным затратам анализ продуктивности и других количественных признаков в течение многих лет в различных эколого-географических зонах для того, чтобы определить адаптивную значимость разных сочетаний генов. Очевидно, что эффективность такого маркирования в существенной степени будет зависеть от используемого типа МГМ, поскольку полиморфизм структурных генов, их различных внутренних участков, анонимных последовательностей ДНК может существенно отличаться как по механизмам возникновения, частоте мутационных событий, так и по постоянству генетического сцепления в потомстве между разными типами МГМ и маркируемыми ими признаками.

Таким образом, к настоящему времени возникла необходимость систематизации данных о полиморфизме различных типов молекулярно-генетических маркеров у культурных растений и домашних животных, сравнения их применения для решения ряда прикладных задач.

В этой связи в настоящем обзоре проводится анализ существующих технологий молекулярных маркеров, а также особое внимание уделяется новым методам ДНК-фингерпринта с помощью ретротранспозонов.

Биохимические маркеры. Можно выделить два основных приложения МГМ в исследованиях генетического компонента изменчивости количественных признаков — картирование и генетическое маркирование участков хромосом, в которых локализованы главные гены фенотипических признаков, а также предсказание их наследования, ассоциированного с передачей аллельных вариантов маркерных генов.

Для этих целей во многих работах используют генетически детерминированный полиморфизм различных белков (биохимические маркеры). Они удобны для анализа генетической изменчивости, поскольку, как правило, экспрессируются кодоминантно, позволяя типировать гетерозиготы и анализировать любое число таких маркеров, одновременно сегрегирующих. Таким образом, изучение генетических ресурсов с использованием биохимических маркеров является достаточно удобным приемом. Это позволяет решать задачи успешного создания коллекций, сохранения и использования диких и культурных растений [4, 8, 18].

Молекулярно-генетические маркеры, основанные на выявлении с помощью электрофореза полиморфизма кодирующих участков структурных генов, обладают следующими свойствами: аллельные варианты всегда связаны с изменением нуклеотидной последовательности в экзонах — самой консервативной части генома; обычно известна хромосомная локализация генов; исследуемые белки традиционно имеют хорошо изученную биохимическую функцию; изменение электрофоретической подвижности белка отражает изменение его заряда — характеристика, находящаяся, как правило, под контролем факторов отбора в мультимакромолекулярных структурах живой клетки.

Следовательно, генетически детерминируемый полиморфизм белков служит маркером одновременно структурного гена, сегмента хромосомы, где он локализован, звена в метаболической сети, которую он контролирует, а также изменений электрохимических характеристик макромолекулярных структур, в которых он участвует.

Следует отметить, что именно использование электрофоретически выявляемого генетически детерминированного полиморфизма белков (биохимических маркеров структурных генов) привело к открытию возможностей прямого прикладного применения достижений молекулярной генетики — использованию ее методов в селекции и частной генетике, сохранении биоразнообразия [16,19].

Маркеры ДНК. Имеется целый набор современных технологий выявления полиморфизма на уровне ДНК. Наиболее эффективной, конечно, является технология с использованием "микрочипа" на основе полиморфизма по единичному нуклеотиду - SNP (Single Nucleotide Polymorphism) [55]. Этот метод делает генетический анализ максимально специализированным, позволяет исследовать различия на уровне тканей одного организма, однако в связи с дороговизной его доступность ограничена. Среди более широко распространенных методов выявления полиморфизма последовательностей ДНК выделяются следующие: анализ полиморфизма длин рестриктных фрагментов ДНК (ПДРФ или RFLP); анализ полиморфизма с помощью ПЦР (RAPD, ISSR, AFLP, SSR).

RFLP (ПДРФ). ПДРФ-оценка полиморфизма длины рестриктных фрагментов ДНК может проводиться разными способами, но наиболее традиционен метод с использованием блот-гибридизации [51]. Он включает в себя выделение ДНК, получение фрагментов рестрикции, их электрофоретическое разделение, перенос на фильтры с последующей гибридизацией специфических ДНК-зондов с полученными фрагментами ДНК. ДНК-зонд - относительно короткая последовательность клонированной ДНК с определенным уровнем гомологии и способностью гибридизоваться с соответствующим участком геномной ДНК [20, 39]. Комбинации рестриктаз и зондов дают высоковоспроизводимые полиморфные спектры фрагментов ДНК, специфичные для каждого индивидуума. Различия между последними могут быть обусловлены, например, мутациями, меняющими сайт рестрикции. ПДРФ имеет ряд важных преимуществ, среди которых - высокая воспроизводимость спектров в разных лабораториях, кодоминантное "поведение" маркера. ПДРФ эффективен при картировании генома, маркировании генов многих биологических и хозяйственно важных признаков. Использование ПДРФ позволило в короткие сроки существенно заполнить генетические карты различных видов растений (томаты, кукуруза и др.), домашних животных (крупный рогатый скот, овца, свинья и др.) [21, 22], а также человека.

У этого метода есть свои достоинства и недостатки. К недостаткам, ограничивающим возможности его применения в широкомасштабных исследованиях на популяционном уровне, относятся следующие: 1) необходимо соответствующее обеспечение ДНК-зондами для достоверного анализа различий на внутривидовом уровне и исследования их подходящих комбинаций, прежде чем скрининг разнообразия может быть действительно проведен; 2) требуется относительно большое количество высокомолекулярной ДНК; 3) неполная пенетрантность аллельных вариантов при работе с признаками продуктивности; 4) наличие изменчивости негенной природы; 5) сложности локализации аллельных вариантов относительно структурного гена. Более перспективным для селекционных программ является использование тандемных повторов, фланкирующих важные кодирующие участки структурных генов, поскольку они облегчают поиск маркеров, сцепленных с главными генами признаков продуктивности.

Несколько лучшие перспективы просматриваются при использовании в качестве проб высоковариабельных участков ДНК, известных как мини- и микросателлитные локусы (VNTR - Variable Number of Tandem Repeats). Этот метод реализован в работах Джеффри и получил название "фингерпринт" ("отпечатки пальцев") [35]. Тандемные повторы широко распространены в разных геномах и высокополиморфны. В результате высокой вариабельности этих участков ДНК ПДРФ-анализ с зондами к микро- и минисателлитным последовательностям позволяет получать мультилокусные спектры с высоким разрешением на популяционном уровне. Благодаря очень высокому уровню полиморфизма этот подход в настоящее время является хорошим инструментом для анализа внутри- и межпопуляционной изменчивости и определения генетических расстояний между группами различных организмов.

VNTR-аллельные варианты имеют кодоминантный характер наследования, однако эти маркеры оказываются в ряде случаев слишком мультилокусными (а их локусы — мультиаллельными), поэтому получаемые спектры очень сложны для анализа из-за большого количества аллелей каждого локуса, т.е. для обработки получаемых данных по классической генетической модели нужны специальные статистические приемы, что крайне усложняет задачу и делает точность анализа родства с использованием VNTR-технологии проблематичной. Конечно, можно пытаться выбрать отдельные локусы (один-два мультиаллельных локуса VNTR), но это удлиняет предскрининговый процесс.

Полимеразная цепная реакция. Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР, PCR) предполагает использование специфических праймеров и получение дискретных ДНК-продуктов амплификации отдельных участков геномной ДНК [1, 28, 45]. Большое количество родственных технологий построено на этом принципе. Наиболее широко используемая RAPD-технология основана на анализе амплифицированных полиморфных фрагментов ДНК с помощью единичных праймеров с произвольной нуклеотидной последовательностью.

RAPD. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) - полимеразная цепная реакция с использованием одного декануклеотидного праймера с произвольной нуклеотидной последовательностью [23, 24, 62, 63]. Продукт RAPD образуется в результате амплификации фрагмента геномной ДНК, фланкированной инвертированной последовательностью данного праймера. Метод удобен для исследований разных видов при использовании одних и тех же праймеров. Основной проблемой этого метода является его чувствительность к изменениям условий реакции (буфер, полимеразы и концентрации компонентов реакции) и даже характеристик амплификатора (уменьшенная стабильность условий, например при отсутствии термостатированной крышки). Температура реакции отжига достаточно низкая (37°C), что увеличивает вероятность образования продуктов амплификации (ампликонов) с большим количеством неспаренных оснований (ошибки отжига).

В качестве МГМ необходимо учитывать только наиболее четкие и хорошо воспроизводимые (при повторной амплификации) продукты ПЦР. Нельзя использовать в анализе ампликоны, плохо видные при электрофорезе. Яркие полосы образуются в результате амплификации фрагментов, фланги которых полностью комплементарны последовательности праймера, а тусклые - в результате ошибок отжига праймера. Чем больше таких ошибок, тем хуже амплифицируются RAPD-продукты и тем сложнее воспроизводить их при изменении условий реакции. Обычно праймеры, использование которых позволяет выявлять межсортовую дифференциацию у одного вида растений, оказываются эффективными для выявления межсортовых различий и у сортов близкородственного и даже дальнего вида.

Однако RAPD-технология имеет ряд недостатков. Во-первых, в зависимости от праймеров и условий реакции не всегда воспроизводятся результаты ПЦР [52]; во-вторых, RAPD-маркеры, как правило, ведут себя как доминантные, и их гетерозиготное состояние не отличается от гомозиготного. Это не исключает применения RAPD-технологии в популяционном анализе и при идентификации генетических ресурсов, но при этом точность оценок по сравнению с кодоминантными маркерами снижается.

Специальные исследования возможностей метода привели к весьма важному выводу: для того чтобы уровень статистической достоверности данных, полученных при RAPD-анализе, соответствовал таковому при использовании кодоминантных маркеров, необходима в 2—10 раз большая выборка исследованных организмов [66]. К основным свойствам RAPD можно отнести следующие: доминантный тип наследования (присутствие-отсутствие); относительно низкая точность (праймер в 10 нуклеотидов может давать такой же спектр ампликонов, как и праймер в 15 или 8 нуклеотидов [23, 24]); зависимость от характеристик амплификатора (для большинства амплификаторов максимальная длина амплифицируемого фрагмента – 2500-3000 пар нуклеотидов); локализация в геноме неизвестна; функция неизвестна [3, 24, 40, 41, 66].

Проблема широкого использования RAPD связана исключительно с особенностью произвольных праймеров в ПЦР. Далеко не каждая нуклеотидная последовательность может использоваться как праймер в ПЦР и не каждая последовательность встречается в геноме с высокой частотой в инвертированном состоянии и "удобной" для ПЦР. Повышая температуру отжига до 55°C и выше (даже для 10-членных праймеров), подбирая более "качественную" последовательность праймеров в отношении их размеров (15—18 нуклеотидов) и уменьшения потенциальных ошибок отжига, можно существенно улучшить воспроизводимость спектров продуктов амплификации в RAPD [14].

Начиная с 1990 г. метод RAPD активно используется, в частности в генетике растений - для некоторых из видов растений с его помощью построены генетические карты. Как правило, исследования с использованием RAPD выполняются следующим образом: из большого количества декануклеотидов эмпирическим путем подбираются такие "десятки", которые дают у данного объекта исследований наиболее легко типизируемые продукты амплификации, воспроизводимые при повторных исследованиях ДНК, несколько раз выделенной из одного и того же источника, т.е. подбираются из имеющихся наиболее удобные праймеры. Причем для решения некоторых задач, например генетической паспортизации особей или сортов, удобнее подбирать праймеры с большим количеством ампликонов, для межвидовых сравнений — с более простым спектром продуктов амплификации. И если практическая значимость использования RAPD внутри вида как высокополиморфных молекулярно-генетических маркеров анонимных последовательностей ДНК очевидна, то их привлечение к решению проблем генетических взаимосвязей между различными группами организмов остается достаточно спорным до сих пор. Накапливаются данные о том, что, как и в случае использования электрофоретических вариантов белков, микросателлитных локусов, оценки генетических расстояний с привлечением RAPD маркеров могут существенно варьировать от локуса к локусу, от таксона к таксону [6].

ISSR. Улучшение метода RAPD достигается с помощью увеличения точности отжига (увеличения длины праймера) и уменьшения его "случайности" — анонимности. К одному из таких методов относится использование ISSR-маркеров (Inter-Simple Sequence Repeat). В этом методе, также как и в RAPD, используется один или несколько праймеров длиной 15-24 нуклеотида [15, 67]. Но в данном случае праймеры состоят из tandemных коротких 2-4 нуклеотидных повторов, например 5'-CA CA CA CA CA CA CA CA G и одного селективного нуклеотида на 3'-конце праймера [3,7]. Продукты ISSR-амплификации содержат на флангах инвертированную микросателлитную последовательность праймера. Так как в данном методе последовательность праймеров специфична и подбирается более строго, чем в RAPD, фингерпринт обычно лучше воспроизводим [37,49]. Проблема "сильных" и "слабых" ампликонов остается, но уже в меньшей степени. Необходимо подбирать последовательность ISSR-праймеров более строго и использовать в анализе только "яркие" продукты ISSR-амплификации. Выявляемый полиморфизм с помощью ISSR, как правило, выше и более четко воспроизводим, чем в RAPD [5, 43].

В геномах растений и животных количество микросателлитных повторов очень велико, что делает этот метод удобным для генетического анализа. Микросателлитные последовательности окружают многие гены и могут использоваться как якорные последовательности к этим генам. Как и RAPD, ISSR не требует предварительного клонирования и секвенирования фрагментов для подбора праймеров. Этот метод начал развиваться в 1994 г., а к настоящему времени получил широкое распространение, особенно в исследованиях генофондов различных видов растений [5, 43]. К основным свойствам ISSR относятся: доминантный тип наследования; относительно высокая точность и улучшенная воспроизводимость по сравнению с RAPD в связи с большей длиной праймера (19-23 пары нуклеотидов) и более высокой температурой отжига. Однако локализация продуктов амплификации в геноме, так же как и их функция, остаются неизвестными. Предполагается их относительно равномерное распределение по длине генома, как и микросателлитных локусов. Количество ампликонов при использовании динуклеотидного микросателлитного повтора в качестве праймера должно быть больше, чем при использовании тринуклеотидного повтора. Спектр должен существенно отличаться между таксонами в зависимости от преобладания в них отдельных вариантов микросателлитных локусов. Предполагается также, что изменчивость спектра ампликонов при использовании ISSR-маркеров не зависит от факторов отбора, событий эволюционного ранга, а связана только со временем расхождения между группами организмов.

В наших исследованиях сопоставлены оценки дифференциации диких популяций сои и сортов культурной сои с использованием полиморфизма биохимических маркеров и ISSR [2, 5]. Получены следующие данные. Полиморфизм биохимических маркеров у исследованных представителей дикой и культурной сои оказался существенно меньшим, чем ISSR-маркеров, однако был удобнее для четкой сортовой идентификации и оценки дифференциации между дикими популяциями и культурными растениями.

Для того чтобы проверить предположение о преимущественной "нейтральности" ISSR-маркеров, мы попытались оценить особенности распределения отдельных микросателлитных локусов на модельном объекте. К настоящему времени в качестве модельных объектов предковых геномов различных видов растений принято рассматривать такие растения, как рис и арабидопсис, наиболее полно секвенирован геном *Arabidopsis thaliana* L. [27].

В целях сравнения полиморфизма потенциальных спектров ампликонов были рассмотрены частоты встречаемости сайтов гомологии к праймерам, использованным для выявления полиморфизма у сортов и диких популяций сои, в нуклеотидных последовательностях вида *Arabidopsis thaliana*. Получены данные о том, что степень полиморфизма спектра ампликонов связана с долей

потенциальных сайтов отжига данного праймера, приходящейся на последовательности структурных генов [5]. Это согласуется с общепринятой точкой зрения на эволюцию последовательностей, кодирующих и не кодирующих белки. Чем большая доля потенциальных праймеров локализована в некодирующих районах, тем больше вероятность возникновения мутационных событий, дифференцирующих близкие группы организмов, поскольку известно, что уровень мутационных событий в не кодирующих белки районах ДНК выше по сравнению с кодирующими.

Таким образом, использование одного ди- и тринуклеотидного праймера дает возможность получать мультилокусные спектры ампликонов, позволяющие отличать популяции дикой сои от культурной, сорта культурной сои друг от друга, однако их информативность (полиморфность), по-видимому, зависит от присутствия сайтов гомологии к ним в кодирующих/не кодирующих белки районах. Полученные данные свидетельствуют о том, что отличия в полиморфизме между локусами вносят определяющий вклад в оценку генетических расстояний между группами организмов при использовании как структурных генов, так и анонимных последовательностей ДНК [26, 27, 32, 36]. Вероятно, определяющее значение в воспроизводимости оценок генетических расстояний имеет не метод маркирования генетических элементов, а процентное соотношение локусов среди включаемых в анализ, прямо или косвенно являющихся мишенями факторов отбора или событий эволюционного ранга, а также нейтральных к этим процессам.

Интересно отметить, что использование одних и тех же фрагментов микросателлитных локусов в качестве праймеров в ISSR позволило получить данные о принципиальных отличиях спектров продуктов амплификации относительно их полиморфизма у разных таксонов. Так, для диких и культурных видов сои наибольшее количество продуктов амплификации и наиболее полиморфные спектры наблюдали при использовании в качестве праймеров фрагментов динуклеотидных микросателлитных повторов по сравнению с тринуклеотидными повторами [2, 5], а у 8 исследованных видов *Ungulata* и человека, наоборот, те же динуклеотидные повторы приводили к формированию менее сложных полиморфных спектров продуктов амплификации ISSR, чем тринуклеотидные повторы. Следовательно, такое сравнение спектров продуктов амплификации, получаемых с использованием разных микросателлитных повторов, свидетельствует об отличиях в их распределении по геномам видов, принадлежащих разным царствам. Из этого следует, что такие маркеры, кроме всего прочего, могут использоваться для выяснения специфики распределения микросателлитных локусов по геномам, т.е. как инструмент в изучении геномной организации определенного типа повторов.

AFLP. Технология AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) представляет собой нечто промежуточное между ПДРФ- и RAPD-анализом. AFLP — сложный метод и состоит из нескольких этапов: геномная ДНК рестрицируется двумя рестриктазами (*EcoRI* и *MseI*) с образованием фрагментов с выступающими 3'-концами. Затем рестрицированная геномная ДНК лигируется с адаптером, содержащим "липкие" концы для данных рестрикционных сайтов. После этого проводятся две последовательные ПЦР [57, 60]. В первой (преамплификация) используются праймеры, полностью комплементарные адаптерам *EcoRI* и *MseI*. После первой ПЦР образуется большое количество продуктов амплификации между адаптерами *EcoRI* и *MseI*, которые невозможно дифференцировать с помощью электрофореза. Поэтому во второй ПЦР праймеры с адаптерами *EcoRI* и *MseI* содержат на 3'-конце дополнительные и некомплементарные адаптерам основания (от 1 до 3) для селективной амплификации. Разделение фрагментов ДНК выполняется в полиакриламидном геле с радиоактивной или флуоресцентной меткой.

Получаемый фингерпринт ДНК обычно высокополиморфен и, как правило, хорошо воспроизводим. Однако AFLP-маркерная система, как и RAPD, яв-

ляется все же в основном доминантной по типу наследования аллельных вариантов. Идентичность в гелях амплифицированных непалиморфных ДНК-фрагментов одной и той же длины часто недоказуема. Полиморфизм AFLP выше, чем RAPD и ISSR. Эта технология позволяет определять генетические изменения, вызванные точечными мутациями в сайтах рестрикции или в участках отжига праймеров (присутствие или отсутствие продукта амплификации в спектре) и небольшими вставками-делециями внутри рестрикционного фрагмента (изменение размера полосы в спектре).

Этот метод получил широкое распространение, однако остается сравнительно дорогим и сложным. Малейшие изменения на каждом этапе приводят к "ложному" полиморфизму и ошибочной трактовке результатов. МГМ, выявленные методом AFLP, легко картируются на хромосомах, однако многие из них локализируются в центромерных и гетерохроматиновых районах хромосом, по-видимому, в связи с неравновероятным распределением сайтов узнавания используемых рестриктаз.

SSR. SSR (Simple Sequence Repeats) - метод ПЦР с фланкирующими праймерами к короткому мини- или микросателлитному повтору позволяет выявлять маркеры с кододминантным наследованием и, соответственно, удобен для выявления гетерозигот по данному локусу. Однако одна пара праймеров для флангов в ПЦР позволяет рассматривать полиморфизм только одного локуса. Для многих микросателлитных локусов не удается выявить полиморфизм. Как правило, фланкирующие последовательности для данного микросателлитного локуса оказываются видоспецифичными. Вместе с тем природа фрагмента, полиморфизм которого изучается, известна, т.е. нет неопределенности, характерной для фрагментов, выявляемых RAPD- и AFLP-методами, или для случайных проб ПДРФ.

К основным свойствам микросателлитных локусов можно отнести сложный характер распределения по генам. Так, имеются таксономические предпочтения в распространении разных повторов, в частности для растений типично преобладание AT-повтора, для млекопитающих - CA-повтора, у человека предположительно 50 000 микросателлитных локусов на геном - 1 на 30 тысяч пар оснований, у арабидопсиса - 1 на 430 тысяч пар оснований (в 14 раз реже). Для их выявления необходимы праймеры к флангам микросателлитного локуса. Аллельные варианты микросателлитного локуса оцениваются как продукты амплификации разной длины (разное количество повторов) при использовании пары праймеров к его флангам. Для таких локусов типичен высокий уровень полиморфизма (мутируют в 1000 раз чаще, чем структурные гены) и наличие специфических механизмов возникновения аллельных вариантов (ошибки репликации, ошибки кроссинговера). По микросателлитным локусам обнаруживается высокий уровень гетерозиготности [44].

В наших исследованиях выполнено экспериментальное сопоставление полиморфизма некоторых биохимических маркеров и микросателлитных локусов у пород крупного рогатого скота. Так, рассмотрены распределения аллельных и генотипических вариантов у 4 пород крупного рогатого скота по традиционному биохимическому маркеру трансферрину (TF) и микросателлитному локусу HVJ 246. Несмотря на большее количество аллельных вариантов по локусу TF (4 аллельных варианта), его гетерозиготность у всех пород была ниже, чем по локусу HVJ 246 (3 аллельных варианта). Распределение аллельных частот по локусу TF характеризовалось определенной породной специфичностью, а по локусу HVJ 246 аллельные варианты встречались почти с одинаковой частотой у всех пород. Полученные данные свидетельствуют, по-видимому, о разном времени возникновения в различных механизмах поддержания полиморфизма двух рассмотренных вариантов МГМ [11].

ДНК-фингерпринт с помощью ретротранспозонов. В настоящее время методы RAPD, ISSR, AFLP и SSR легли в основу создания новых типов МГМ, использующих последовательности ретротранспозонов для анализа геномов.

На основе RAPD при использовании в качестве праймеров коротких последовательностей ретротранспозонов возник метод IRAP. ISSR получил свое продолжение в REMAP, в котором используются оба варианта праймеров — из ретротранспозона и микросателлита. AFLP привел к возникновению более специализированного метода, основанного на последовательностях ретротранспозонов - SSAP. И, наконец, полиморфизм микросателлитных локусов, SSR, с использованием локус-специфичных праймеров к флангам микросателлитного повтора привел к развитию метода RBIP, в котором используют праймеры, фланкирующие сайты ретротранспозиции. Такого развития этих методов можно было ожидать, поскольку в большинстве продуктов RAPD-, ISSR- и AFLP -амплификации обнаруживались последовательности, соответствующие ретротранспозонам.

Ретротранспозоны — мобильные генетические элементы, широко представленные в геномах всего царства эукариот и составляющие огромную часть геномной ДНК (до половины генома у растений) [42] (рис. 1). Они распространяются по всем геномам и локализуются во всех хромосомах. Большая часть ретротранспозиции, как правило, локализуется в сами ретротранспозоны или другие повторы (последовательности "AF254799" "ГенБанк") [34, 53, 54]. Ретротранспозоны используют как промежуточный этап жизненного цикла копирование своей РНК в ДНК с помощью обратной транскрипции и фермента Rnase H в копию ДНК, которая встраивается в ДНК хозяина с помощью интегразы IN (рис. 1). Новые ретротранспозиции в геноме хозяина в зависимости от локализации могут приводить к изменениям активности генов, как положительным, так и отрицательным [25, 38], и даже индуцировать хромосомные изменения. Длинные концевые повторы (LTR) ретротранспозонов несут регуляторные сайты, опознаваемые некоторыми ядерными факторами [56].

К настоящему времени геномы ряда эукариот, в том числе и человека, полностью секвенированы [33]. Оказалось, что большая часть исследованных геномов представлена различными типами повторов, существенный вклад в которые вносят ретротранспозоны. Например, в геноме человека только 5 % генома образуют последовательности, кодирующие РНК и белки, более 50 % генома состоят из повторов, основную часть которых составляют ретротранспозоны — длинные диспергированные повторы (Long Interspersed Elements, LINE) (21 %), короткие диспергированные повторы (Short Interspersed Elements, SINE) (13 %) и LTR — ретровирусоподобные элементы (8 %) [33]. Для растений характерна сходная картина: более половины генома составляют ретротранспозирующие элементы. Очевидно, что такая их представленность в геномах позволяет широко использовать эти последовательности в качестве МГМ.

В случае МГМ на основе ретротранспозонов их полиморфизм связан с уникальным биологическим процессом ретротранспозицией в результате встраивания ретротранспозона в новый участок геномной ДНК без потери первоначального участка в ней. Ретротранспозиция может вовлекать в себя от

LTR ретротранспозон



Non-LTR ретротранспозон

LINE



SINE



Рис. 1. Общая структура ретротранспозонов. LTR-содержащие ретротранспозоны включают в себя короткий прямой повтор с каждого LTR. LTR имеет три участка (U3, R и U5), содержащие сигналы начала и конца транскрипции. Между LTR кодируются гены, необходимые для жизненного цикла ретротранспозона: белок капсида (GAG), эндонуклеаза (EN), интегразы (INT), протеаза (PR), обратная транскриптаза (RT) и Rnase H; участок связывания с тРНК (PBS), полипуриновый участок (PPT), нетранслируемый 5'- и 3'-участки (5'UTR, 3'UTR), промоторы для РНК-полимеразы III (Pol A и промотор Pol B)

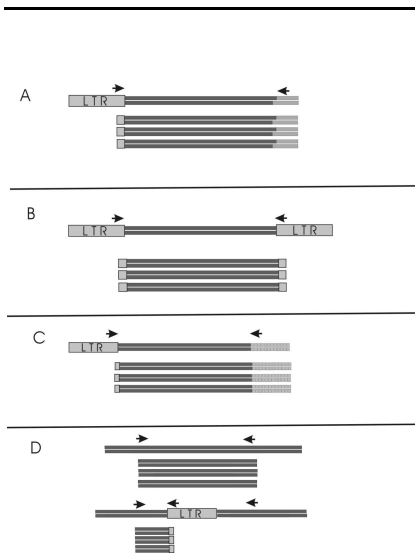


Рис. 2. Стратегии молекулярных маркеров на основе ПЦР-ретротранспозонов.

A — SSAP (Sequence Specific Amplification Polymorphism), геномная ДНК после рестрикции с помощью PstI и MseI лигируется с адаптерами к данным рестриционным сайтам с последующей ПЦР с праймерами из LTR и адаптера; *B* — IRAP (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism), ПЦР между инвертированными праймерами (праймером) из LTR ретротранспозона; *C* — REMAP (REtrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism), ПЦР между праймером из LTR ретротранспозона и праймером из простого микросателлитного повтора (например, 5'- CA CA CA CA CA CA CA CA G); *D* — RBIP (Retrotransposon-Based Insertion Polymorphism), мультилокусная ПЦР с использованием праймерсш, фланкирующих ретротранспозицию, и праймера с LTR-ретротранспозона

нескольких сотен нуклеотидов до нескольких тысяч, она необратима, что облегчает наблюдение и использование этого процесса. Кроме того, насчитывается до десятка тысяч копий на геном для некоторых ретротранспозонов [42], причем потенциально каждая копия может быть использована как МГМ.

Выше уже отмечалось, что к настоящему времени разработано несколько новых типов МГМ с использованием последовательностей ретротранспозонов (рис. 2).

SSAP. Метод SSAP (Sequence Specific Amplification Polymorphism) явился модификацией метода AFLP. Принцип SSAP состоит в следующем (см. рис. 2, *A*) [30, 61]. ДНК исследуемых образцов расщепляется рестриктазами PstI и MseI, образуя фрагменты с выступающими 3'-концами. Затем рестрицированная ДНК лигируется с PstI- и MseI-адаптерами. Первая ПЦР (преамплификация) проводится с праймерами от PstI- и MseI-адаптеров, т.е. амплифицируются все возможные комбинации сочетания этих адаптеров в рестрицированной геномной ДНК. После первой ПЦР образуется большое количество продуктов амплификации фрагментов ДНК, локализованных между праймерами и адаптерами. ПЦР-продукты разбавляются и используются для второй, селективной ПЦР, которая проводится с меченым праймером к LTR и любым праймером адаптеров либо с PstI или MseI. Во второй ПЦР можно использовать праймеры к адаптеру с дополнительными нуклеотидами на 3'-конце, например один, два или три нуклеотида, некомплементарные адаптеру. Электрофорез после второй ПЦР проводят в полиакриламидном геле или в секвенаторе, если используется флуоресцентная метка. Продукты амплификации после второй ПЦР образуются в результате амплификации фрагмента

ДНК между LTR и адаптером. Получение продуктов амплификации между только LTR-последовательностями принципиально возможно, но, как правило, расстояние между двумя ретротранспозонами длиннее обычно получаемых ПЦР-продуктов (2,5-3,0 тысячи пар оснований). А продукты амплификации между адаптерами не будут выявляться, поскольку используется метка только для LTR-праймера.

К достоинствам метода относится высокий уровень полиморфизма и хорошая, стабильная воспроизводимость спектров продуктов амплификации. Полиморфизм, выявляемый SSAP, выше, чем при использовании метода AFLP на одних и тех же исследуемых образцах.

Этот метод имеет те же недостатки, что и AFLP. К ним относится его многоступенчатость и технические трудности, связанные с этим. Метод требует

привлечения дорогих реактивов и приборов. В случае неполной рестрикции геномной ДНК (необходимо высокое качество выделенной ДНК образца) и/или лигирования адаптеров возможно возникновение ложного полиморфизма.

Полиморфизм SSAP-маркеров может быть обусловлен как событиями ретротранспозии, так и точечными мутациями в области рестрикции или в комплементарной последовательности LTR-праймера. Поэтому невозможно быть уверенным в том, что "появление" или "исчезновение" продукта амплификации в образце обусловлено ретротранспозицией.

SSAP-маркеры использовались для картирования генома ячменя и овса [30,61,64]. Показана их локализация по всем хромосомам. Оказалось, что основная их масса локализуется в центромерных районах хромосом. Данный метод и праймеры могут применяться для исследования близкородственных видов, поскольку наиболее распространенные ретротранспозоны обычно достаточно консервативны у видов одного семейства, особенно их концевые участки LTR [61]. Так, последовательность ретротранспозона BARE-1 обнаруживается не только у ячменя, но и у других видов трибы *Hordeum* [30, 54,58,59]. Очень многие ретротранспозоны одного вида находятся и в геномах других родственных видов, некоторые ретротранспозоны обнаруживаются и у достаточно удаленных видов. Например, LTR пшеничного ретротранспозона WIS-2A ("ГенБанк" "X57168") выявлен у вида *Spartina alterniflora* с высоким уровнем комплементарности (87 %, 311 нуклеотидов из 356 оказались комплементарными).

IRAP и **REMAP**. Следующие два новых и простых метода - IRAP (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism) и REMAP (Retrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism) [37]. IRAP - полимеразная цепная реакция между праймерами, комплементарными последовательностями двух рядом расположенных LTR ретротранспозона (см. рис. 2, В).

Метод имеет несколько вариантов. В первом используется единичный праймер из LTR. Продукты амплификации образуются между двумя инвертированными LTR с одинаковой последовательностью, т.е. в одной цепи 5'-конец одного LTR ориентирован к 3'-концу другого. Если центральная часть ретротранспозона длиннее обычных ПЦР-продуктов (около 3 тысяч пар оснований), то ПЦР пройдет только между двумя LTR из разных ретротранспозиций. В этом случае соседние LTR должны располагаться в инвертированном положении. В другом варианте IRAP используются два разных праймера к инвертированным LTR: один с 5'-конца, а другой — с 3'-конца LTR, ориентированные в разные стороны от ретротранспозона. В данном случае соседние LTR располагаются как прямые длинные повторы. И наконец, в третьем варианте IRAP используются праймеры к LTR из разных ретро- транспозонов в различной ориентации.

REMAP — полимеразная цепная реакция между праймером к фрагменту LTR ретротранспозона и праймером из рядом расположенного простого микросателлитного повтора (SSR-праймер) (см. рис. 2, С). В данном случае позиция амплифицируемого фрагмента ретротранспозона "заякоривается" путем использования праймера к микросателлитному локусу. Например, у растений удобным оказывается использование праймера к LTR и праймера к микросателлиту (5'-CA CA CA CA CA CA CA CA CA CA G) с единичным селективным нуклеотидом на 3'-конце праймера. В REMAP применяют варианты LTR-праймеров как для 5'-, так и для 3'-конца LTR, как и в IRAP. Перед использованием праймеров необходимо проверить их комплементарность (не образуют ли они димеры между собой) с помощью программы "FastPCR" (<http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/Programs/>).

К достоинствам этих двух методов относятся их относительная простота и потенциально большое количество комбинаций праймеров из различных ретротранспозонов и микросателлитов (REMAP). Поскольку в геномах растений и животных выявляют большое количество ретротранспозонов, потенциаль-

ная информативность (количество локусов и их полиморфизм) методов IRAP и REMAP очень велика. Последовательности праймеров к LTR подбираются из консервативных и концевых участков LTR. Большинство LTR на 5'- и 3'-концах имеют консервативные последовательности, необходимые для ретро-транспозиции. В основном праймеры подбираются к концам LTR таким образом, чтобы амплифицированные продукты были достаточно удобны для ПЦР и электрофореза. Представляется возможность использовать праймеры к различным консервативным участкам LTR или центральной, кодирующей части ретротранспозона, поскольку в геномах присутствует большое количество неполноценных ретротранспозонных последовательностей, образованных, в частности, вследствие рекомбинации геномной ДНК.

Очень важный аспект получения всех МГМ, основанных на ПЦР, это воспроизводимость фингерпринтов. В этой связи особую важность приобретает подбор праймеров и условия ПЦР. В обоих методах, IRAP и REMAP, используются праймеры, полученные к последовательностям после "выравнивания" нескольких последовательностей одного типа LTR, и к наиболее длинным, полностью комплементарным участкам подбираются высокоспецифичные праймеры с высокой температурой плавления. Подбор праймеров к консервативным участкам LTR увеличивает количество ампликонов и позволяет уменьшить вероятность выявления полиморфизма, обусловленного точечными заменами в последовательностях, комплементарных праймеру, и способствовать выявлению истинных транспозиций. Поскольку праймеры подбираются к наиболее консервативным участкам LTR, то праймеры к LTR одного вида, как правило, подходят для анализа МГМ близкородственных видов, а в некоторых случаях, в зависимости от типа ретротранспозона, — даже для удаленных видов. Обычно для этого типа МГМ характерны достаточно жесткие условия ПЦР — высокая температура отжига (от 60 до 68°C), 1,5 мМ MgCl₂, стандартная концентрация праймеров (0,2 мкМ) и Taq-полимеразы. Электрофорез продуктов амплификации проводится в 2 %-м агарозном геле с бромистым этидием.

Получаемый полиморфизм продуктов амплификации с помощью IRAP и REMAP не уступает SSAP, но оба метода несравнимо проще и удобней, чем SSAP и AFLP. Новые продукты амплификации при IRAP образуются в результате переноса одного ретротранспозона в позицию, расположенную рядом с другим. Они могут принадлежать одному и тому же ретротранспозону или разным. Последовательность между ретротранспозонами может быть представлена, в свою очередь, последовательностью другого ретротранспозона, может быть кодирующей последовательностью или некодирующей (если продукт амплификации IRAP короткий, до 1000 пар оснований, то, скорее всего, это продукт амплификации некодирующей последовательности). Большинство транспозиций происходит в повторы, и, как правило, в другие ретротранспозоны [48, 50].

Некоторые ретротранспозоны относительно равномерно распределяются по длине генома, это, в частности, BARE-1. Это показано с помощью гибридизации *in situ* с пробамми из LTR и кодирующей части ретротранспозона. Некоторые короткие ретротранспозоны, как MITE, достаточно часто локализируются вблизи кодирующих последовательностей [50].

Вместе с тем продукты REMAP-амплификации фланкируются микросателлитной последовательностью. Известно, что микросателлиты располагаются как вблизи генов, так и в некодирующей ДНК. Поэтому МГМ REMAP могут иметь более широкое применение, чем IRAP, поскольку выше вероятность того, что продукты REMAP-амплификации не кластеризуются в участках хромосом, где повышенное количество повторов, а равномернее распределяются по хромосомам.

Эти методы использованы для исследования полиморфизма и генетической структуры сортов *H. vulgare* и видов семейства *Hordeum* [37], с применением праймеров к ретротранспозону ячменя BARE-1. Экспериментальные

исследования показали их высокую эффективность и удобство для выявления молекулярных маркеров у растений. Получены данные о том, что основные продукты REMAP-амплификации образуются в результате амплификации фрагментов только между ретротранспозонным и микросателлитным праймерами. Количество IRAP- или ISSR-продуктов амплификации, образованных, соответственно, только с помощью микросателлитного праймера или только праймера к фрагменту ретротранспозона, очень незначительно в REMAP. Повидимому, это обусловлено тем, что ретротранспозоны часто окружены микросателлитными локусами. Возможно, локализация микросателлитных повторов является участками предпочтительной транспозиции ретротранспозонов [53]. Следует учитывать также, что более короткие продукты ПЦР легче амплифицируются, чем длинные, и что расстояние между двумя ретротранспозонами или двумя микросателлитами больше, чем расстояние между ретротранспозоном и микросателлитом. При сравнении амплификации с использованием пары праймера LTR и микросателлита, и единичным праймером с LTR и единичным ISSR-праймером, показано, что в последних двух случаях продукты ПЦР представлены длинными полинуклеотидами (2000—4000 пар оснований), тогда для REMAP длина продуктов ПЦР составляет от 200 до 4000 пар оснований [37].

REMAP и IRAP успешно использованы для детального картирования генома ячменя и поиска маркеров, сцепленных с генами устойчивости к *Pyrenophora teres* [43]. Количество продуктов REMAP/IRAP-амплификации варьировало от 20 до 40, а их длина — от 100 до 3000 пар оснований. Среднее количество полиморфных полос у двух сортов ячменя (Rolfi и CI9819) зависело от метода выявления полиморфных продуктов. Например, в IRAP с единичным LTR-праймером из ретротранспозона "Sukkula" ("ГенБанк" "AF254799") образовывалось 35 продуктов амплификации, из которых 15 были полиморфны. Они были картированы на различных хромосомах ячменя.

На рис. 3 представлен IRAP-фингерпринт сортов ячменя с использованием одиночного праймера из LTR-ретротранспозона "Sukkula". Продукты ПЦР исследовались в 2 %-м агарозном геле с бромистым этидием, электрофорез проводили при напряжении тока до 80—100 вольт, в течение 7 ч (гель 20 x 20 см). Молекулярная масса продуктов амплификации варьировала от 100 до 3000 пар нуклеотидов, большинство из которых полиморфны. Рассматривались некоторые широко используемые европейские озимые сорта: Sonja, Romanze, Igri, Borwinia, Express, Gaulois, Franka, Marinka, Rondo и яровые: Union, Krona, Natasha, Volga, Chariot, Hart, Dandy, Type, Golden Promise, Aramir, Zephyr, Georgie, Hora, Alexis, Grit, Corniche, Prisma, Triumph, Derkado, Cooper, Veка. Сорта перечислены в порядке расположения выделенных из них образцов ДНК на электрофореграмме. Все сорта легко идентифицируются по сочетанию зон амплификации. Отдельный полиморфный продукт, как правило, обнаруживается более чем у одного сорта. Исключение представляет только итальянский сорт Rondo, который имеет особое происхождение по сравнению с другими европейскими сортами и уникальные продукты амплификации, обнаруженные только у этого сорта.

RBIP. В методах SSAP, IRAP и REMAP рассматриваются МГМ, которые, как правило, имеют доминантный характер наследования продуктов амплификации, поскольку их наличие не позволяет отличать гомозиготу от гетерозиготы. Разработан еще один метод, основанный на использовании праймеров к последовательностям ретротранспозонов — RBIP (Retrotransposon-Based Insertion Polymorphisms). Этот метод позволяет исследовать кодоминантные аллельные варианты (см. рис. 2, D) [29]. Его принцип основан на мультилокусной ПЦР, в которой используются пара праймеров, фланкирующих участок ДНК до ретротранспозиции, и праймер к LTR-ретротранспозона, встроенный в данный участок между первыми двумя праймерами. В результате ПЦР будет амплифицироваться один из вариантов фрагментов, фланкированных парой праймеров, поскольку последовательность между LTR слишком

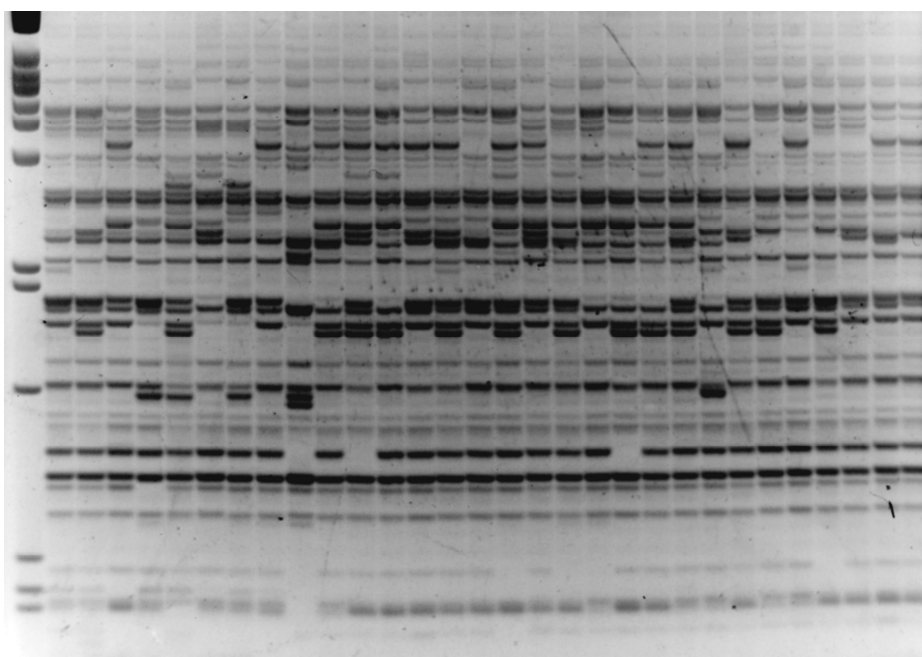


Рис. 3. Электрофорез (в агарозном геле с окрашиванием бромистым этидием) IRAP -амплификации ДНК сортов ячменя с помощью одиночного праймера из LTR-ретротранспозона "Sukkula" (5'-GAT AGC GTC GCA TCT TGG GCG TGA C). Маркер — ДНК фага λ , рестрицированная PstI. Условия ПЦР: первая денатурация — 94°C, 2 мин., затем 30 циклов реакции: 94°C — 20с, отжиг 60°C — 20с и элонгация 2 мин, последняя элонгация длится 10 мин. Реакционная смесь на 20 мкл: 50 mM трис-HCl; pH 8,3; 50 mM KCl; 0,01 % Tween-20, 1,5 mM MgCl₂, 20 нг ДНК, 0,2 мкМ праймера и 1 ед. Taq-полимеразы

длинная для ПЦР между сайтами геномной ДНК с ретротранспозоном внутри. Этот метод выявляет полиморфизм только для данного локуса. К его достоинствам относят кодоминантность полиморфных вариантов, возможность использования для дот-блот анализа большого количества сортов. Главный же недостаток — необходимо клонирование и секвенирование последовательностей участка ДНК до и после ретротранспозиции. Это относительно сложная и дорогостоящая процедура. Возможно ее облегчение, например секвенирование полиморфных продуктов ПЦР после IRAP, REMAP или SSAP, и использование затем инвертной ПЦР для полиморфного участка полиморфного продукта. Но инвертная ПЦР также является достаточно трудоемким процессом, требующим дополнительного анализа клонов, их секвенирования и проверочной ПЦР.

На рис. 4 представлен результат электрофоретического разделения амплифицированных продуктов ПЦР одного локуса "SB17—WB17" генома ячменя (хромосома 4HL) в популяции DH линий Igrі/Triumph, содержащего ретротранспозон BARE-1. Продукт амплификации с наименьшим размером соответствует наличию ретротранспозона в данном локусе, а с большим — нет. Они получены после выделения продуктов REMAP-амплификации (праймеры: BARE-1 LTR: GGA ATT CAT AGC ATG GAT AAT AAA CGA TTA TC и 5'-CTC CTC CTC CTC CTC CTC CTC G), длиной в 1524 пары оснований. Этот продукт обнаруживается у большинства европейских яровых форм ячменя.

Другой теоретически возможный подход к выявлению полиморфизма фрагментов ДНК, в которых локализируются последовательности ретротранспозонов, основан на использовании метода "CODE" [65] для клонирования делетированных фрагментов ДНК. В данном случае будет создана библиотека участков ДНК, в которые произошла ретротранспозиция. Этот подход состоит из нескольких этапов, но позволяет сразу получить большое количество фраг-

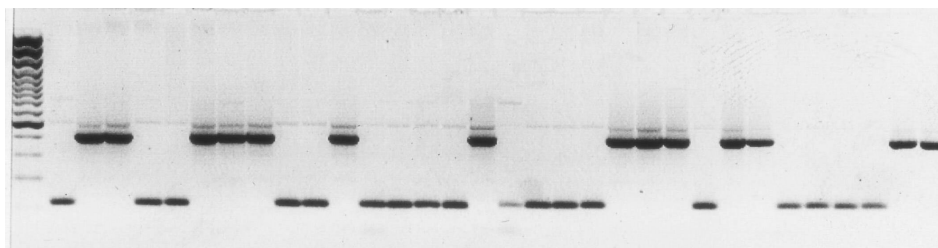


Рис. 4. Электрофорез продуктов RВIP амплификации локуса "SB17—WB17" из генома ячменя в популяции ДН линий Igrі/Triumph. Праймеры из исследуемого локуса: "WB17L": 5'-GTG TCC TCG GAA CGA GCA GG "ISB17L168": 5'-GCC TCA CAG GAT TTT GAG GAG G и праймер с LTR BARE-1: 5'- GGC ATA TTT CCA ACA CCA CTT CC (последовательность LTR выделена полужирным шрифтом). Продукт амплификации 91 основания соответствует наличию ретротранспозиции ретротранспозона BARE-1 в данном локусе, продукт ПЦР в 384 основания — отсутствие ретротранспозиции. Маркер ДНК — "GeneRuler I 100bp DNA Ladder Plus" ("Fermentas") от 100 до 3000 нуклеотидов, "толстая" полоса соответствует 500 нуклеотидам

ментов геномной ДНК, в которых локализованы ретротранспозоны, и оценить их полиморфизм. Геномные ДНК исследуемого сорта или линий и сравнимой (контрольной) формы рестрицируются тремя рестриктазами BamHI, BglII и BclI. Рестрицированная ДНК лигируется со специфическими адаптерами. ДНК из контрольной формы амплифицируют с dUTP и немодифицированными праймерами к адаптерам. А ДНК из исследуемой формы амплифицируют с биотинилированными праймерами к адаптерам с обычными трифосфонуклеотидами (dNTP). Продукты амплификации (размером не более 2000 пар оснований) денатурируют и гибридизуют. И затем обрабатывают урацил-ДНК-гликозилазой, чтобы полностью разрушить фрагменты ДНК из контрольной формы, а также с помощью S1 нуклеазы из проростка золотистой фасоли, чтобы разрушить все гетерогенные гибриды. Остаются только полноценные гибриды исследуемой ДНК. Эта процедура повторяется 3 раза. Затем фрагменты ДНК амплифицируют, клонируют в плазмидном векторе и секвенируют. Далее проводится ПЦР фрагмента между праймером к LTR и праймерами, полученными из этих клонов к ДНК из исследуемой формы. Если образуется продукт амплификации, из этого следует, что найдена ретротранспозиция. RВIP-метод удобен для анализа гетерозиготных популяций, так как будут амплифицироваться оба аллеля данного локуса. Метод имеет перспективу, но дорог и трудоемок.

В заключение подчеркнем, что генетический полиморфизм, выявляемый с помощью молекулярных маркеров, является центральным звеном в современном генетическом анализе. Как правило, внутри каждого типа МГМ отдельные локусы существенно отличаются друг от друга по полиморфизму, сложности и воспроизводимости их выявления. Решение каждой конкретной задачи требует подбора оптимальных молекулярно-генетических маркеров. Методы молекулярно-генетического маркирования на основе ретротранспозонов на данный момент являются эффективными инструментами в исследовании генетического полиморфизма растений и животных.

1. Булат С.А., Кобаев О.Н., Мироненко Н.В. и др. Полимеразная цепная реакция с универсальными праймерами для изучения геномов // Генетика. — 1992. — 28, № 5. — С. 19—28.
2. Глазка В.И. Генетически детерминированный полиморфизм ферментов у некоторых сортов сои (*Glycine max*) и дикой сои (*Glycine soja*) // Цитология и генетика. — 2000. — 34, № 2. — С. 77—84
3. Глазка В.И. ДНК технологии животных. — Киев: Нора-принт, 1997. — 160 с.
4. Глазка В.И., Доманский Н.Н., Созиное А.А. Современные направления использования ДНК технологий // Цитология и генетика. — 1998. — 32, № 5. — С. 80—93.
5. Глазка В.И., Дубинин А.В., Календарь Р.Н. и др. Генетические взаимоотношения между сортами сои, оцененные с использованием ISSR маркеров // Там же. — 1999. — 33, № 5. — С. 47—52.
6. Глазка Г.В., Рогозин И.Б., Глазка В.И. и др. Экспериментальные и расчетные спектры ампликонов UBC-85 и UBC-126 (RAPD-PCR) // Там же. - 1997. - 33, № 5. - С. 32-35.

7. Глазко В.И., Созинов И.А. Генетика изоферментов животных и растений. — Киев: Урожай, 1993. — 528 с.
8. Конарев А.В. Белки растений как генетические маркеры. — М.: Наука, 1983. — 168 с.
9. Конарев А.В. Всероссийский НИИ растениеводства и его вклад в развитие сельскохозяйственной науки и селекции страны // С.-х. биология. — 1994. — № 3. — С. 13—75.
10. Левонтин Р. Генетические основы эволюции. — М.: Мир, 1978. — 351 с.
11. Панасенко Г.В., Глазко В.И. Полиморфизм трансферрина и микросателлита НШ 246 у четырех пород крупного рогатого скота // Тез. докл. Междунар. конф. "ДНК-технологии". — Киев: Аграрна наука, 1997. — С. 47—48.
12. Семихов В.Ф. Об адаптивной роли проламинов в эволюции и распространении семейства злаков // Журн. общ. биологии. — 1990. — 51, № 3. — С. 327—331.
13. Сиволап Ю.М., Календарь Р.Н. Генетический полиморфизм ячменя, детектируемый ПЦР с произвольными праймерами // Генетика. — 1995. — 31, № 10. — С. 1358—1364.
14. Сиволап Ю.М., Календарь Р.Н., Нецветаев В.П. Использование продуктов полимеразной цепной реакции для картирования генома ячменя (*Hordeum vulgare*) // Там же. — 1997. — 33, №1. — С. 53—60.
15. Сиволап Ю.М., Календарь Р.Н., Чеботарь С.В. Генетический полиморфизм растений, детектируемый ПЦР с произвольными праймерами // Цитология и генетика. — 1994. — 28, № 6. — С. 54—61.
16. Сулимова Г.Е. Генотипирование локуса каппа-казеина у крупного рогатого скота с помощью полимеразной цепной реакции // Генетика. — 1991. — 27, № 12. — С. 2053—2062.
17. Хавкин Э.Е. Молекулярные маркеры в растениеводстве // С.-х. биология. — 1997. — № 5. — С. 3—21.
18. Allaby R.G., Banerjee M., Brown T.A. Evolution of the high molecular weight glutenin loci of the A, B, D, and G genomes of wheat // Genome. — 1999. — 42, N 2. — P. 296—307.
19. Allard R.W. Genetic changes associated with the evolution of adaptedness in cultivated plants and their progenitors // J. Hered. — 1988. — 79, N 4. — P. 225—238.
20. Ausubel P.M., Brent R., Kingston R.E. et al. Current protocols in molecular biology. — New York: Wiley, 1997. — 630 p.
21. Bishop D.T., Williamson I.A., Skolnick M.N. A model for restriction fragment length distribution // Amer. J. Hum. Genet. — 1983. — 35. — P. 795—815.
22. Botstein D., White R.L., Skolnick M. et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction length polymorphisms // Ibid. — 1980. — 32. — P. 314—331.
23. Caetano-Anolles G. MAAP: a versatile and universal tool for genome analysis // Plant Mol. Biol. — 1994. — 25. — P. 1011—1026.
24. Caetano-Anolles G. Scanning of nucleic acids by in vitro amplification: New developments and applications // Nature Biotechnol. — 1996. — 14. — P. 1668—1674.
25. Clegg M.T., Durbin M.L. Flower color variation: a model for the experimental study of evolution // PNAS. — 2000. — 97, N 13. — P. 7016—7023.
26. Colsona I., Goldsteina D.B. Evidence for complex mutations at microsatellite loci in drosophila // Genetics. — 1999. — 152. — P. 617—627.
27. Devos K.M., Beaks J., Nagamwa Y., Sasaki T. Arabidopsis-rice: will colinearity allow gene prediction across the eudicot-monocot divide? // Genome Res. — 1999. — 9, N 9. — P. 825—829.
28. Erlich H.A. / Ed. PCR technology: principles and applications for DNA amplification. — New York: Stockton. — 1989. - 450 p.
29. Flavell A.I., Knox M.R., Pearce S.R., Ellis T.H. Retrotransposon-based insertion polymorphisms (RBIP) for high throughput marker analysis // Plant J. — 1998. — 16, N 5. — P. 643—650.
30. Gribbon B.M., Pearce S.R., Kalendar R. et al. Phylogeny and transpositional activity of Tyl-copia group retrotransposons in cereal genomes // Mol. and Gen. Genet. — 1999. — 261(6). — P. 883—891.
31. Harris H., Hopkinson D.A. Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics. — Amsterdam: North-Holland Publ. Corp., 1976. — 680 p.
32. Huttleya G.A., Smith M. W., Carrington M., O'Brien S.J. A scan for linkage disequilibrium across the human genome // Genetics. — 1999. — 152. — P. 1711—1722.
33. International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome // Nature. — 2001. — 409, N 6822. — P. 860—921.
34. Jaaskelainen M., Mykkanen A.H., Arna T. et al. Retrotransposon BARE-1: expression of encoded proteins and formation of virus-like particles in barley cells // Plant J. — 1999. — 20, N 4. — P. 413—422.
35. Jeffreys A.J., Wilson V., Thein S.L. Individual-specific "fingerprints" of human DNA // Nature. — 1985. — 316. — P. 76—79.
36. Joshi C.P., Nguyen H.T. Application of the random amplified polymorphic DNA technique for the detection of polymorphism among wild and cultivated tetraploid wheats // Genome. — 1993. — 36, N 3. — P. 602—609.
37. Kalendar R., Grab T., Regina M.T. et al. IRAP and REMAP: Two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques // Theor. and Appl. Genet. — 1999. — 98. — P. 704—711.
38. Kalendar R., Tanskanen J., Immonen S. et al. Genome evolution of wild barley (*Hordeum spontaneum*) by BARE-1 retrotransposon dynamics in response to sharp microclimatic divergence // Proc Nat. Acad. Sci. USA. — 2000. — 97, N 12. — P. 6603—6607.

39. *Karcher J.S.* Molecular biology: A project approach. — San-Diego; New York; Boston: Acad. Press 1995. — 278 p.
40. *Karlin S., Burge C.* Dinucleotide relative abundance extremes: a genomic significance // *Trends in Genetics*. — 1995. — 11. — P. 283—290.
41. *Karlin S., Ladunga I., Blaisdell B.E.* Heterogeneity of genomes: measures and values // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. — 1994. — 91. — P. 12837—12841.
42. *Kumar A., Bennetzen J.L.* Plant retrotransposons // *Annu. Rev. Genet.* — 1999. — 33. — P. 479—532.
43. *Manninen O., Kalendar R., Robinson J., Schulman A.H.* Application of BARE-1 retrotransposon markers to the mapping of a major resistance gene for net blotch in barley // *Mol. Gen. and Genet.* — 2000. — 264, N 3. — P. 325—334.
44. *Meagher R.B., McLean M.D., Arnold J.* Recombination within a subclass of restriction fragment length polymorphisms may help link classical and molecular genetic // *Genetics*. — 1988. — 120. — P. 809—818.
45. *Mullis K.B., Faloona F.* Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction // *Meth. enzymol.* — 1987. — 155. — P. 335—350.
46. *Nevo E.* Genetic variation in natural populations: patterns and theory // *Theor. Pop. Biol.* — 1987. — 13, N 1. — P. 121—177.
47. *Nevo E., Belles A.* Genetic diversity of wild emmer wheat in Israel and Turkey. Structure, evolution, and application in breeding // *Theor. and Appl. Genet.* — 1989. — 77, N 3. — P. 421—455.
48. *Ramsay L, Macaulay M., Cardie L. et al.* Intimate association of microsatellite repeats with retrotransposons and other dispersed repetitive elements in barley // *Plant J.* — 1999. — 17, N 4. — P. 415-425.
49. *Rychlik W., Spencer W.J., Rhoads R.E.* Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro // *Mol. Cell Res.* — 1990. — 18, N 21. — P. 6409—6412.
50. *Shirasu K., Schulman A., Lahaye N., Schulze-Lefert P.* A contiguous 66-kd barley DNA sequence provides evidence for reversible genome expansion // *Genome Res.* — 2000. — 10. — P. 908—915.
51. *Southern E.* Detection of specific sequences among DNA fragments separated by electrophoresis // *Mol. Biol.* — 1975. — 98. — P. 503—517.
52. *Sunnucks P.* Efficient genetic markers for population biology // *Trends Ecol. Evol.* — 2000. — 15, N 5. — P. 199—203.
53. *Suoniemi A., Tanskanen J., Pentikainen O. et al.* The core domain of retrotransposon integrase in Hordeum: Predicted structure and evolution // *Mol. Biol. Evol.* — 1998. — 15. — P. 1135—1144.
54. *Suoniemi A., Tanskanen J., Schulman A.H.* Gypsy-like retrotransposons are widespread in the plant kingdom // *Plant J.* — 1998. — 13. — P. 699—705.
55. *Syvanen A.C., Aalto-Setälä K., Harju L. et al.* A primer-guided nucleotide incorporation assay in the genotyping of apolipoprotein E // *Genomics*. — 1990. — 8, N 4. — P. 684—692.
56. *Tikhonov A.P., Bennetzen J.L., Avramova Z.V.* Structural domains and matrix attachment regions along colinear chromosomal segments of maize and sorghum // *Plant Cell*. — 2000. — 12, N 2. — P. 249—264.
57. *Tamos C.M., Vos P., Zabeau M. et al.* Identification of amplified restriction fragment polymorphism (AFLP) markers tightly linked to the tomato Cf9 gene for resistance to *Cladosporium fulvum* // *Plant J.* — 1995. — 8. — P. 785—794.
58. *Vicient C.M., Jaaskelainen M.J., Kalendar R., Schulman A.H.* Active retrotransposons are a common feature of grass genomes // *Plant Physiol.* — 2001. — 125, N 3. — P. 1283—1292.
59. *Vicient C.M., Kalendar R., Ananthawat-Jonsson K., Schulman A.H.* Structure, functionality and evolution of the BARE-1 retrotransposon of barley // *Genetica*. — 1999. — P. 53—63.
60. *Vos P., Hogers R., Bleeker M. et al.* AFLP: a new technique for DNA fingerprint // *Nucl. Acids Res.* — 1995. — 23. — P. 4407—4414.
61. *Waugh R., Bonar N., Baird E. et al.* Homology of AFLP products in three mapping populations of barley // *Mol. and Gen. Genet.* — 1997. — 255, N 3. — P. 311—321.
62. *Welsh J., McClelland M.* Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers // *Nucl. Acids Res.* — 1990. — 18. — P. 7213—7218.
63. *Williams J., Kubelik A., Livak K. et al.* DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers // *Nucl. Acids Res.* — 1990. — 18. — P. 6513—6535.
64. *Yu G.X., Wise R.P.* An anchored AFLP- and retrotransposon-based map of diploid *Avena* // *Genome*. — 2000. — 43, N 5. — P. 736—749.
65. *Zabarovska V., Li J., Muravenko O., Fedorova L et al.* CIS-cloning of identical sequences between two complex genomes // *Chromosome Res.* — 2000. — 8, N 1. — P. 77—84.
66. *Zaykin O., Zhivotovskiy L., Weir B.S.* Exact tests for association between alleles at arbitrary numbers of loci // *Genetica*. — 1995. — 96. — P. 169—178.
67. *Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D.* Genome fingerprinting by sequence repeat (SSR) — anchored polymerase chain reaction amplification // *Genomics*. — 1994. — 20. — P. 176—183.

Получено 13.08.2001

ТИПИ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИХ МАРКЕРІВ ТА ЇХ ЗАСТОСУВАННЯ

*Р.М. Календар*¹, *В.І. Глазко*²

¹Інститут біотехнології, Хельсинки, Фінляндія

²Інститут агроєкології і біотехнології Української академії аграрних наук, Київ

Розглядаються різні типи молекулярно-генетичних маркерів поліморфізму ділянок ДНК, їхні переваги і недоліки, а також спектри завдань, що вирішуються за їх допомогою. Особлива увага приділяється методам виявлення поліморфізму з використанням послідовностей ретротранспозонів. Вони складають основну частину геномної ДНК еукаріот і виявляються в усіх хромосомах. Ці методи є розвитком відомих методів — RAPD, ISSR, і AFLP. Методи IRAP і REMAP дозволили спростити дослідження і зробити ретротранспозони реальними інструментами в генетичному аналізі. Показано, що методи, засновані на аналізі послідовностей, що несуть ретротранспозони, є ефективними інструментами в дослідженні генетичного поліморфізму рослин і тварин.

TYPES OF MOLECULAR-GENETIC MARKERS AND THEIR APPLICATION

R.N. Kalendar^{1,2} *V.I. Glazko*²

¹Institute of Biotechnology, University of Helsinki, Biocentre 1, P.O. Box 56, Viikinkaari, 6, 00014, Helsinki, Finland

²Institute of Agricoecology and Biotechnology of Ukrainian Academy of Agrarian Sciences 12 Metrologichnaya, Kyiv, 03143, Ukraine

The various types of molecular-genetic markers of DNA's sequences polymorphism, their advantages and disadvantages, and also spectra of tasks solved with their help were considered. The special attention was given to methods of DNA polymorphism revealing with the use of retrotransposone sequences. They make the basic part of eukaryote genome DNA and localized in all chromosomes. These methods were development of known methods — RAPD, ISSR and AFLP. The methods IRAP and REMAP had allowed to simplify investigations and to make the retrotransposons by real tools in the genetic analysis. It was shown, that the methods, based on the analysis of sequences, carrying the retrotransposons, were effective tools in research genetic polymorphisms of plants and animals.

Key words: polymorphism, fingerprint, proteins, RFLP, RAPD, ISSR, AFLP, retrotransposons, SSAP, IRAP, REMAP, RBIP.