

М.В. Дыбков, Г.Д. Телегеев, М.Р. Столина, С.С. Малюта.

**ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ
И СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЛИНИЙ МЫШЕЙ CC57W/Mv,
C57Bl/6 И BALB/c МЕТОДОМ ГЕНОМНОЙ ДАКТИЛОСКОПИИ.**

Методом геномной дактилоскопии с зондом на основе фага M13 проведен анализ линий мышей BALB/c, C57Bl/6 и выведенной на их основе линии CC57W/Mv. Показано, что все три изученные линии представляют собой генетически однородные, четко дифференцированные друг от друга группы. Генетические дистанции между линиями составили: для линий CC57W/Mv-C57Bl/6 - 0,144; CC57W/Mv-BALB/c 0,182; C57Bl/6-BALB/c - 0,395.

Введение. После открытия в 80-м году гипервариабельных участков генома (ГУГ) [1] и появления первых работ по их изучению, возникли новые перспективы для эффективного генетического маркирования организмов. Высокая гетерозиготность локусов, кодоминантный характер наследования, значительное количество и диспергированность в геноме - все это позволило использовать ГУГ в качестве высокоинформативных генетических маркеров. Помимо этого геномные профили, то есть картины выявляемые при геномной дактилоскопии, характеризуются соматической и онтогенетической стабильностью, а также высокой индивидуальной специфичностью [2]. Открытие того, что зонды, содержащие последовательность гена III фага M13 выявляют гипервариабельные участки генома многих организмов дало новый толчок развитию геномной дактилоскопии ввиду доступности данного зонда и его универсальности [3,4].

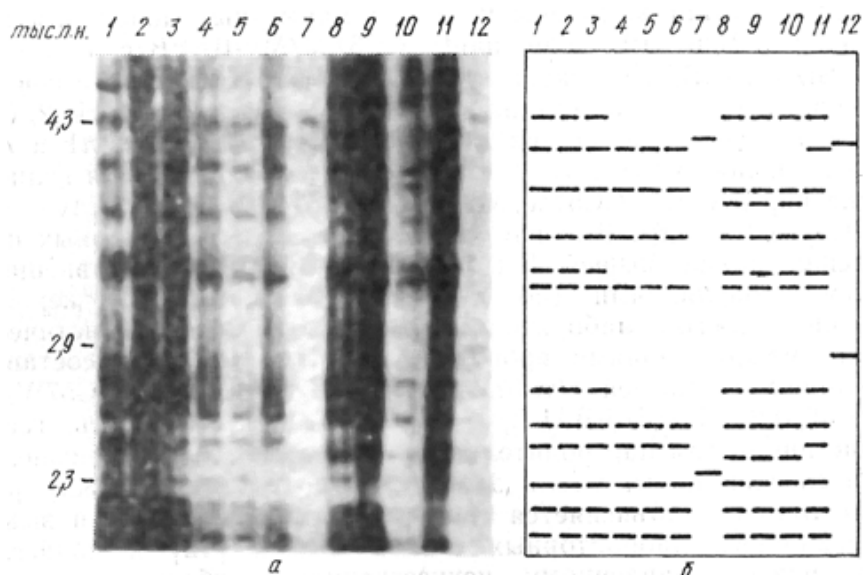
Одна из областей применения геномной дактилоскопии - проведение контроля и оценки генетической однородности изучаемых групп организмов и в частности линейных объектов. Показано, что при использовании геномной дактилоскопии значительно повышается эффективность инбредной селекции в сторону одного из родителей, т.е. данный метод позволяет снизить число возвратных скрещиваний, необходимых для достижения нужной степени гомозиготности [5]. Геномная дактилоскопия позволяет контролировать чистоту линий, которые поддерживаются в разных лабораториях, и предупреждать возможные ошибки при проведении экспериментов [6]. Геномная дактилоскопия позволяет проводить анализ практически любых биологических объектов - животных, растений, клеточных линий и др. В настоящее время большое внимание уделяется созданию программ обработки и интерпретации геномных профилей и созданию на их основе баз данных с характеристическими описаниями эталонных линий, популяций, видов и т.п. К настоящему времени накоплена обширная библиотека геномных профилей большого числа инбредных линий мышей и крыс [7].

В данной работе методом геномной дактилоскопии с зондом на основе фага M13 были проанализированы линии BALB/c, C57Bl/6 и выведенная на их основе линия CC57W/Mv, поддерживаемые в Институте молекулярной биологии и генетики НАН Украины, поскольку данные линии мышей предполагается использовать в модельной системе для изучения генетических и молекулярно-биологических эффектов хронического низкодозового облучения.

Материалы и методы. Объекты исследования. Объектами исследования были

инбредные линии мышей BALB/c и C57Bl/6, а также выведенная на их основе линия CC57W/Mv, поддерживаемые в виварии Института молекулярной биологии и генетики (ИМБиГ) НАН Украины более 20 поколений путем братско-сестринских скрещиваний.

Выделение ДНК. Для анализа были взяты ткани хвоста мышей линий BALB/c, C57Bl/6 и CC57W/Mv. Образцы ткани замораживали и хранили до выделения ДНК. Ткани механически измельчали и суспендировали в лизирующем буфере с протеиназой К (50 mM tris-HCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 10 mM ЭДТА; 1% SDS; 50 мкг/мл протеиназыК), а затем инкубировали при 37 С в течение ночи. После этого образцы подвергали фенол-хлороформной обработке [8] и после осаждения спиртом растворяли в ТЕ буфере.



Геномный профиль мышей линии CC57W/Mv - 1-3,11; C57Bl/6 - 4-6; BALB/c - 8-10 (а) и его схематическое представление. Маркеры молекулярной массы λ /HindIII и M13/ClaI

Рестрикция и фракционирование ДНК. По 10 мкг каждого образца ДНК обрабатывали рестриктазой BspRI в течение 4 часов. Рестрикты переосаждали с ацетатом аммония и растворяли в дистиллированной воде. Фракционирование проводили в 0,95% агарозном геле в течение 36-48 часов при 1,5-2 В/см. После этого ДНК электрофоретически переносили на капроновые мембраны "Хиу Калур" и фиксировали прогревом в вакууме 2ч при 80°C.

Гибридизация. Зонд с высокой удельной активностью получали достройкой на односторонней форме фага M13 при помощи праймера, отжигающегося вблизи гена III. Гибридизацию проводили как описано в [9]. После отмывки фильтры экспонировали в течение 3-14 суток с пленкой PM-1 в кассетах с усиливающими экранами.

Результаты и обсуждение. На рис. 1 представлен один из геномных профилей трех вышеперечисленных линий. В изучаемой области 10-2 т.п.н. выявлено 12 маркерных полос для линии BALB/c, 9 маркерных полос для линии C57Bl/6 и 12 для линии CC57W/Mv. При анализе гибридизационных картин не было выявлено каких-либо индивидуальных и половых отличий внутри каждой из линий мышей. При сравнительном анализе изучаемых линий выявлено 7 маркерных полос общих для всех 3-х линий мышей. Данные маркеры вероятно относятся к маркерам, характеризующим ту или иную группу организмов. Наряду с этими маркерами были выявлены те полосы, которые позволяют провести четкую дифференциацию всех трех линий мышей друг относительно друга. На рис.1 показаны 3 маркерные полосы общие для линий BALB/c и CC57W/Mv и отсутствующие у линии C57Bl/6, а также 2 маркерные полосы общие для линий C57Bl/6 и CC57W/Mv и

отсутствующие у линии BALB/c. Показательно, что три отличающиеся маркерные полосы прослеживаются в высокомолекулярной области геномного дактоотпечатка. Во многих работах [2,10] показано, что высокомолекулярные маркеры характеризуются более высоким уровнем гетерозиготности в популяции и различия, описанные по маркерам данной группы, наиболее достоверны. При попарном сравнении линий мышей было выявлено 9 общих маркерных полос для пары CC57W/Mv-C57Bl/6; 10 для пары CC57W/Mv-BALB/c и 7 для пары C57Bl/6-BALB/c. Схожесть линий оценивали по частоте совпадения маркерных полос (частоту находили по формуле $S=2*n_{1,2}/(n_1+n_2)$, где $n_{1,2}$ -число общих полос для 2-х объектов, а n_1 и n_2 -общее число полос у объектов 1 и 2 соответственно). Данная величина составила: для пар BALB/c - CC57W/Mv 0,83; C57Bl/6 - CC57W/Mv -0,86; BALB/c-C57Bl/6 - 0,67. Высокая частота совпадения маркерных полос родительских линий мышей BALB/c-C57Bl/6 (0,67) по сравнению с природными популяциями (по разным оценкам 0,2-0,5) вероятно вызвана инбридингом лабораторных животных. Оценку генетических расстояний между линиями проводили по Неи [11]. Они составили: между линиями мышей CC57W/Mv-C57Bl/6 - 0,144; CC57W/Mv - BALB/c - 0,182; C57Bl/6 - BALB/c - 0,395. Как и ожидалось, генетические дистанции для пар родительская -дочерняя линия меньше, чем для родительской пары. Столь значительная дистанция между родительскими линиями объясняется тем, что данные линии были выведены из различных лабораторных стоков мышей [12] и подверглись сильному разнонаправленному искусственному отбору путем длительного инбридинга.

Из изложенного выше следует, что проанализированные линии являются высокооднородными, четко дифференцированными друг от друга генетическими группами. Полученные при геномной дактилоскопии характеристики позволяют проводить эффективный контроль состояния линий мышей в модельной системе.

М. В. Дибков, Г. Д. Телегеев, М.Р. Столина, С.С. Мalyuta

ВИВЧЕННЯ ГЕНЕТИЧНОЇ СТРУКТУРИ ТА ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ ЛІНІЙ МИШЕЙ CC57W/Mv, C57Bl/6 І BALB/c МЕТОДОМ ГЕНОМНОЇ ДАКТИЛОСКОПІЇ

Резюме

Методом геномної дактилоскопії з використанням зонду на основі фага M13 проаналізовано лінії мишей BALB/c, C57Bl/6 і виведену на їх основі лінію CC57W/Mv. Показано, що всі три вивчені лінії є генетично однорідними, чітко диференційованими одна від одної групами. Генетичні дистанції між лініями складають: для ліній CC57W/Mv-C57Bl/6—0,144; CC57W/Mv -BALB/c —0,182; C57Bl/6-BALB/c— 0,395.

M. V. Dybkov, G. D. Telegeev, M. R. Stolina, S.S. Malyuta

STUDY OF GENETIC STRUCTURE AND COMPARATIVE ANALYSIS OF MOUSE STRAINS CC57W/Mv, C57Bl/6, BALB/c USING METHOD DNA FINGERPRINTING

Summary

Using the method DNA fingerprints with pbipR DNA as a probe were made analysis mouse strains BALB/c, C57Bl/6, the progenitors CC57W/Mv inbred mouse strain. It was show that everyone mouse strain are genetics homogeneous and differentiation each from other groups. Genetic distance between mouse strains are 0.144 for strains CC57W/Mv-C57Bl/6; 0.182 for strains CC57W/Mv -BALB/c and 0.395 for strains C57Bl/6-BALB/c.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРЫ.

1. Wyman A., White R. A highly polymorphic locus in human DNA //Proc. Nat. Acad. Sci. USA.-

- 1980.-77, -P.6754-6758.
2. Jeffreys A.J., Wilson V., Wong Z., Roule N., et al. Highly variable minisatellites and DNA fingerprints //Mol. Pathol.: Sump., London.,Dec., 1986. -London, 1987. P. 165-180.
 3. Рысков А.П., Джинчарадзе А.Г., Просняк М.И. и др. Геномная “дактилоскопия” организмов различных таксономических групп: использование в качестве гибридизационной пробы ДНК фага M13 // Генетика.-1988.-24, N.2.-С.227-238.
 4. Vassart G., Georges M., Monsier R.,et al A sequense in M13 phage detects hypervariable minisatellites in human and animal DNA // Science.-1987.-235, N.4789.-P.683-684.
 5. Hiller J., Scaap T., Haberfeld A.,Jeffreys A.J. et al DNA fingerprints applied to gene introgression in breeding programs // Genetics.-1990.-124, N 3.-P.783-789.
 6. Samani N.J., Swales J.P., Jeffreys A.J., Morton D.B. et al. DNA fingerprinting of spontaneously hypertensive and WistarKyoto rats: implications for hypertension reseach // J. of Hypertens.-1989.-7, N.10.-P.809-816.
 7. Deeny A.A., McDonald B. DNA fingerprinting - a step forward in genetic monitoring // Lab. Anim.-1992.-26, N.2.-P.141.
 8. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М., “ Мир”, 1984. -480 с., ил.
 9. Westneat D.F., Noon W.A., Reeve H.K.,Aquadro C.F. Improved hybridization conditions for DNA “fingerprints” probed with M13 // Nucl. Acids Res.-1988.-16, N.9.-P.4161.
 10. A.J. Jeffreys, D.B. Morton DNA fingerprints of dog and cats// Anim. Gen.-1987.-18, N 1.-P.1-15.
 11. M.Nei Molecular population genetics and evolution // North-Holland Publishing Company,-1975.-288 p.
 11. Nei M. Molecular population genetics and evolution - Amsterdam : North-Holland publ., 1975.-288p.
 12. Малашенко А.М., Бландова З.К. Генетическая коллекция мышей (основа создания криоэмбриотеки) // Пушино. -1985. -48 С.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики
НАН Украины, Киев

Получено 19.07.94