

Підвищення інформативності зонда на основі ДНК фага М 13 при дослідженні геному свині

К. Ф. Почерняєв*, К. Н. Кияниця¹, Г. Д. Телегєєв¹, М. В. Дибков¹
С. С. Малюта¹

Інститут свинарства УААН
314006 Полтава, вул. Шведська Могила

¹Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
252143 Київ, вул. Академіка Заболотного, 150

Пропонується модифікація способу приготування гібридизаційного зонда з використанням ДНК фага М13 за допомогою методу ДНК-фінгерпринту

Вступ. Послідовності ДНК, поліморфізм яких обумовлений різною кількістю тандемних повторів VNTR [1], умовно поділяють на міні- та мікросателіти. Існує припущення [2] стосовно еволюції мінісателітів із мікросателітів. Мікросателіти [3] мають розмір повторюваної одиниці 1—10 п. н., мінісателіти [4] — 9—65 п. н. Розмір алельних варіантів складає від 0 до 23 000 п. н. Використання зонда на основі варіабельних послідовностей та гібридизація у м'яких умовах дозволяють виявляти одночасно споріднені алелі різних локусів. Складний набір смуг через високу індивідуальну своєрідність одержав назву ДНК-фінгерпринту. Успадкування алелів VNTR-локусів відбувається за законами Менделя, алельні варіанти соматично стабільні та селективно нейтральні. Така властивість VNTR-локусів дозволяє використовувати їх як молекулярно-генетичні маркери.

Для дослідження геному свині за допомогою техніки ДНК-фінгерпринту застосовували різні багатолокусні зонди: *pYNH24* і *pYNA23* 151, мікросателіти 33.15 і 33.6 [6], що несуть високополіморфну ДНК людини, тандемний повтор *p53* свині та ДНК фага М 13 [8]. Як найдоступніший нами був використаний багатолокусний зонд на основі ДНК фагового вектора М13mp8. Використання ДНК фага М13 можливе завдяки наявності у фаговому гені III двох тандемних повторів з коровим мотивом GAGGGTGGXGGXTCT[9].

За літературними і власними даними, стандартний метод ДНК-фінгерпринту з використанням ДНК фага М13 дозволяє прослідкувати до 9 алельних варіантів геному свині, що поступається іншим зондам. Для підвищення інформативності даного зонда у ДНК-типіванні свиней нами було запропоновано модифікацію методу. Суть її полягала у застосуванні гібридизаційного праймера, комплементарного послідовності у положенні 2401—2420 нуклеотидів, що відповідає фланкуючій області фагового гена III, і розділенні

матриці і міченого зонду. У попередніх методах користувалися універсальними праймерами, комплементарними полілінкерній області, проводячи мічення добудовою другого ланцюга та залишаючи вільними тандемні повтори на матриці.

Матеріали і методи. *Тварини.* Для дослідів були використані свині *Sus scrofa*, кнури порід ландрас, дюрос та кнури, свиноматки і поросята великої білої породи (Станція штучного осіменіння Інституту свинарства, Полтава, колгосп «Україна», Полтавська область).

ДНК виділяли із периферійної крові за фенольним методом [10], із сперми кнурів — власним способом [11]. Рестрикцію ДНК проводили з використанням ендонуклеаз *AluI*, *BsuRI*, *MspI*, *Sau3AI* та *TagI* за умовами постачальника (НВО «Фермент», Вільнюс).

Електрофоретичне розділення фрагментів ДНК здійснювали в 0,8 %-му агарозному гелі у буферній системі трис-борат — ЕДТА протягом 48 год. Напруга становила 2 В/см геля. В одну лунку геля наносили в середньому 5—7 мкг ДНК.

Перенос за Саузерном на капронові фільтри проводили в 0,4 М NaOH. Фрагменти ДНК на капронових фільтрах фіксували протягом 5 хв ультрафіолетовим світлом.

Мічений $\alpha^{32}\text{P}$ гібридаційний зонд на основі ДНК фага М13mp8 готували з використанням специфічного гібридаційного праймера і фрагмента Кленова ДНК-полімерази I. Олігонуклеотид зі структурою 5'-ТТСАТААТСААААТС був синтезований в Інституті молекулярної біології та генетики НАН України (Київ). Реакцію добудови другого ланцюга фрагментом Кленова проводили протягом 5 хв і зупиняли додаванням 0,5М ЕДТА.

Матрицю та синтезований зонд розділяли в 6 %-му акриламідному гелі. Після одержання радіоавтографу зонд елюювали із геля. Гібридизацію здійснювали по [12]. Облік фрагментів ДНК за розмірами на радіоавтографах проводили в діапазоні від 4 до 20 тис. п. н.

Результати і обговорення. Структурна особливість організації VNTR-локусів вимагає використання ферменту рестрикції, який не порушує цілісності варіабельних локусів. Придатність тієї чи іншої рестриктази визначали за здатністю утворювати максимальну кількість смуг на радіоавтографі. Ефект зміни рестриктази добре виїно при гібридизації у

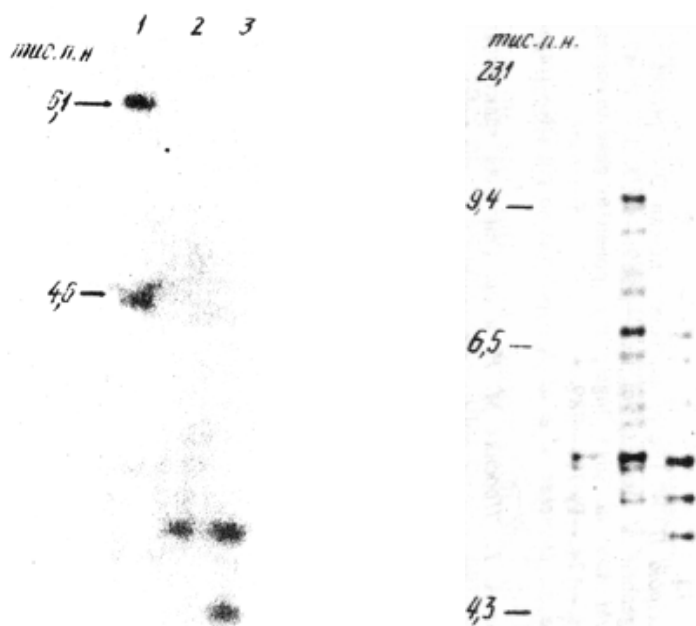


Рис. 1. Гібридизація за Саузерном з використанням зонда ДНК фага М13 як монолокусної проби: 1 — ДНК свині гідролізована *HinfI*; 2, 3 — ДНК, гідролізована *AluI* (різні особини)

Рис. 2. (праворуч) Фінгерпринт ДНК свиней великої білої породи, одержаний з використанням зонда ДНК фага М13

жорстких умовах, за яких зонд ДНК фага М 13 «працює» як монолокусна проба (рис. 1). Так, при заміні *Hinfl* на *AluI* істотно змінилися розміри алелей. Для *Hinfl* це були смуги розміром 4,6 і 6,1 тис. п. н., а для *AluI* — дві смуги розміром менше за 2 тис. п. н., тобто вони знаходяться у зоні, складній для аналізу. Використання рестриктази *MspI* дозволило ідентифікувати найбільшу кількість смуг. Гібридаційні картини ДНК свиней представлені на (рис. 2). Для ДНК свиней спостерігалися індивідуальні особливості гібридації за числом і розміщенням смуг. Основна кількість варіабельних фрагментів містилася у діапазоні від 4 до 10 тис. п. н. Максимальну кількість алельних варіантів у вищезазначеному діапазоні — 24 — мають деякі зразки ДНК свиней великої білої породи.

Таким чином, застосування модифікації методу з використанням гібридаційного праймера, комплементарного послідовності фланкуючої області фагового гена *III*, і розділення матриці і міченого зонда підвищують інформативність зонда ДНК фага М 13 при дослідженні геному свині.

К. Ф. Почерняев, К. И. Кияница, Г. Д. Телегеев, М. В. Дыбков, С. С. Малуца

Повышение информативности зонда на основе ДНК фага М13 при исследовании генома свиньи

Резюме

Предлагается модификация способа приготовления гибридационного зонда с использованием ДНК фага М13 с помощью метода ДНК-фингерпринта.

К. Ф. Почерняев, К. И. Кияница, Г. Д. Телегеев, М. В. Дыбков, С. С. Малуца

M13 phage DNA probe infonnativity rising at studying pig genome

Summary

DNA fingerprinting method is used for solving wide spectre of questions in genetics. One of the method's variants is using DNA M13 phage as a hybridization probe, modification of preparing it being proposed.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Nakanwa Y., Leppert M., O'Connell P. et al* Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gent maching//Science—1987.— 285— P. 1616—1622.
2. *Wright I. M.* Mutation at VNTRS: are minisatellites the evolutionary progeny of microsatellites?// Genome.—1994— 37.—P. 345—347.
3. *Tauti D.* Hypervariability of simple sequences as general source for polymorphic DNA markers // Nucl.AcidsRes.— 1989.—17.—P. 6463—6471.
4. *Jeffreys A. J., Wilson V., Thein S. L.* Hypervariable «minisatellite» regions in human DNA // Nature.—1985.—314.—P. 67—73.
5. *Troyer D. L., Smith I. E., Leipold ff. W.* Use of multiallelic human DNA probes to detect polymorphisms in the porcine genome // Amer. J. Vet. Res.—1989.—50, N 3,— P. 479—481.
6. *Hillel /., Schoap Г., Haberfeld A. et al* DNA fingerprints applied to gene introgresslon in breeding programs //Genetics.—124.—P. 783—789.
7. *Coppieters W., Van de Weghe A., Depicker A. et al* A hypervariable pig DNA fragment // Animal Genet.—1990.— 21, N 1.—P. 29—38.
8. *Рысков А. П., Джынчарадзе А. Г., Просняк М. И. и др.* Геномная «дактилоскопия» организмов различных таксономических групп: использование в качестве гибридационной пробы ДНК фага М13 // Генетика. 1988.— 24, № 2.—С. 227—238.
9. *Vassart O., Georges M., Monsieur R. et al* A sequence in M13 phage detects hypervariable minisatellites in human and animal DNA // Science.—1987.—235.—P. 683—684.
10. *Mathew C. O. P.* The isolation of high molecular weight eukaryotic DNA. Methods in molecular biology / Ed. J. M. Walker.—New York: Humana press, 1984.—Vol. 2.—P. 31—34.
11. *Почерняев К. Ф.* Метод видення ДНК і3 сперми кнур'в // Свинарство.—1995.—51.—С. 31—32.
12. *Westmeat 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.