

КАРПОВА І.С., НЕГРУЦЬКА В.В., *КУЗЬМЕНКО О.Л.,
ПАЛЬЧИКОВСЬКА Л.Г., *ПОЗУР В.К., ЛУКАШ Л.Л.

*Київський Національний університет ім. Тараса Шевченка,

Інститут молекулярної біології та генетики НАН України,

Україна, 0314. Київ, вул. Заболотного, 150, e-mail: lukash@imbg.org.ua

**ДОСЛІДЖЕННЯ МІНЛИВОСТІ ГЕНОМУ
НЕСТАБІЛЬНИХ НАЩАДКІВ ALU-ІНТЕГРАНТІВ *BACILLUS
SUBTILIS* МЕТОДОМ REP-ПЛР
З ВИКОРИСТАННЯМ ПРАЙМЕРІВ
ДО ПОВТОРЮВАНИХ ВОХ-ЕЛЕМЕНТІВ**

Відомо, що значну частину геному еукаріот становлять мобільні генетичні елементи — МГЕ, які можуть впливати на експресію генів, а також призводити до генетичної нестабільності і канцерогенезу [1, 2]. Геноми бактерій також містять повторювані некодуючі послідовності, серед яких найпоширенішими є представники трьох родин — позагенні паліндроми REP (repetitive extragenic palindromic), внутрішньогенні консенсусні послідовності ERIC (enterobacterial repetitive intergenic consensus), та елементи ВОХ [3, 4]. Останні мають міжгенну локалізацію, подвійну симетрію і здатні до формування петлеподібних структур. Метод геномного фінгерпринтингу (гер-ПЛР) базується на використанні праймерів, комплементарних до зазначених повторюваних послідовностей ДНК.

Об'єктом дослідження є одержані нами генетично нестабільні мутанти *Bacillus subtilis*, які містять послідовність Alu-повтору геному людини (Alu-інтегранти) [2, 5]. У попередній публікації показано можливість детекції генетичних перебудов геному Alu-інтегрантів *B. subtilis* методом гер-ПЛР з використанням REP-праймерів. Такий вибір ґрунтувався на відомостях, що REP послідовності, які беруть участь у хромосомних перебудовах бактерій, за консервативністю, сталою паліндромною структурою, локалізацією в некодуючих областях, поширенням геномом нагадують представників Alu-родини геному приматів[1].

Елементи ВОХ, що за своєю структурою нагадують інвертрони, потенційно можуть бути мішенями для взаємодії з іншими МГЕ [7].

Мета даної роботи — дослідження можливості використання ВОХ-праймерів, комплементарних до міжгенних елементів ВОХ, для виявлення перебудов геному серед нащадків Alu-інтегрантів *B. subtilis*, відібраних за ознакою суттєвого порушення росту колоній.

Матеріали і методи

Бактеріальні штами. В роботі використано стандартні штами *B. subtilis* — SHgw, дикий тип, прототроф (“Bacillus Genetic Stock Center”, USA); Lys-42 з колекції ЛІЯФ ім. Константинова РАН, які слугували контролем. Об'єктами дослідження були: похідний від Lys-42 штам ІМБГ 187 (ауксотроф за орнітином Lys⁰orn⁻, містить Alu-повтор геному людини) [5] та його нащадки. Останні умовно розподілено на дві групи за морфологічними (розмір

колоній) та біохімічними (ауксотрофність) ознаками. Першу групу складали мутанти, однакові за ауксотрофністю, але відмінні за розміром колоній: штами 4, 7, 11 (діаметр до 2 мм), штами 18, 22 (до 4 мм, що відповідало розміру колоній батьківського штаму), штами 25, 26 (до 10 мм) та штам 31 — мозаїк з темним центром, розмір якого досягав 25 мм. Другу групу складали субклони мозаїка 31, які формували великі за розміром колонії, але відрізнялись за ауксотрофністю: штами 3/31 і 6/31 — ревертанти Lys^+Orn^+ ; субклон 32 Lys^+Orn^- , що виник як сегмент мозаїка 31 та його ревертанти штами 1/32, 6/32, 12/32 і 14/32 — Lys^+Orn^+ , субклон 33, що виник як світлий прозорий сегмент мозаїка 31, який мав додаткову ауксотрофну мутацію (фенотип $Lys^+Orn^-X^-$) та його ревертант за цією мутацією — штам 3/33.

Мутанти розсівали до окремих колоній та вирощували на повноцінному та мінімальному агаризованому середовищі з відповідними добавками при 37 °С протягом 20–24 год.

Виділення бактеріальної ДНК. Геномну ДНК виділяли з бактеріальної нічної культури клітин (5 мл) за стандартним методом [6]. Концентрацію ДНК, вільну від РНК, визначали на спектрофотометрі Biomate 5 (Thermo electron corporation, США).

Rep-ПЛР проводили з використанням праймерів BOX A1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG -3'). Реакційна суміш, кінцевий об'єм якої становив 50 мкл, містила 50 ng бактеріальної ДНК, 200 nM кожного праймера, 200 mM кожного з нуклеозидтрифосфатів, стандартний буфер для ПРЛ (Fermentas, Литва), 2 mM $MgCl_2$, 0,05% DMSO та 1 од. Taq ДНК-полімерази (Fermentas, Литва). ПЛР було проведено в ампліфікаторі "Терцик" (Росія) з початковою денатурацією 95 °С/6 хв., після чого в реакційну суміш вносили Taq ДНК-полімерази. Умови реакції 94 °С/1 хв — 55 °С/1 хв — 65 °С/8 хв (30 циклів) з кінцевим синтезом — 64 °С/16 хв [4]. Наявність ампліконів визначали за допомогою електрофорезу у 1,2% агарозному гелі. Як маркер молекулярної ваги використовували O'Gene Ruler Express DNA Ladder (Fermentas, Литва) згідно рекомендаціям фірми-виробника. Для аналізу агарозних гелів застосовували програму TotalLab v 2.01.

Результати досліджень

Методом Rep-ПЛР були отримані фінгерпринти ДНК штаму SHgw дикого типу *B. subtilis*, батьківського штаму Lys^-42 , Alu -інтегранта ІМБГ187, а також похідних від нього мутантів (рис. 1) та проведено їхній порівняльний аналіз. У контрольних штамів виявлено 9 фрагментів ДНК, що фланковані BOX-последовностями, і мають такі розміри: 3288–3259; 2804–2777; 2268–2251; 1802–1794; 1209–1174; 898; 515–511; 304; 90–76 нп. Найбільші відмінності від контролю мали високомолекулярні продукти ампліфікації ДНК Alu -інтегранта (рис. 1, доріжки А3 і Б2), розмір яких знаходиться в діапазоні 2831–1585 нп. Відмінності стосувались як збільшення інтенсивності забарвлення відповідних смужок так і зменшення їх розмірів на 400–200 нп. Особливої уваги заслуговує мажорний амплікон розміром 1585 нп (четверта

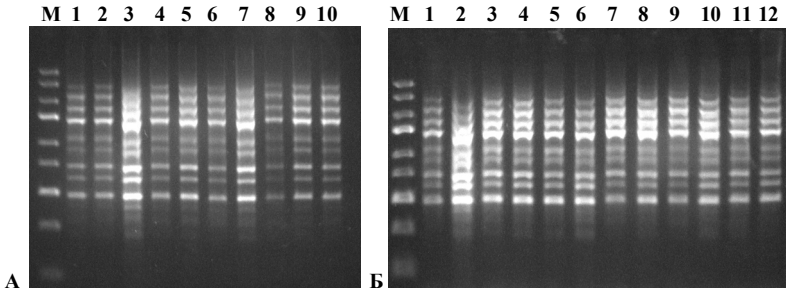


Рис. 1. Електрофореграма результатів ВОХ-аналізу ДНК похідних Alu-інтегранта *B. subtilis* ІМБГ187, що відрізняються за розмірами колоній (гель А): М — маркер (5000, 3000, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 300, 100 нп); штамми: 1 — SHgw (прототроф); 2 — Lys-42 (контроль); 3 — ІМБГ187; 4 — клон 4; 5 — клон 7; 6 — клон 11; 7 — клон 18; 8 — клон 22; 9 — клон 25; 10 — клон 26 та ДНК субклонів Alu-інтегранта ІМБГ187, що відрізняються великими розмірами колоній та змінами ауксотрофності (гель Б): 1 — Lys-42; 2 — ІМБГ187; 3 — 31 (сегмент 1); 4 — ревертант 3/31; 5 — ревертант 6/31; 6 — 32 (сегмент 2); 7 — ревертант 1/32; 8 — ревертант 6/32 клон; 9 — ревертант 12/32; 10 — ревертант 14/32; 11 — 33 (сегмент 3); 12 — ревертант 3/33

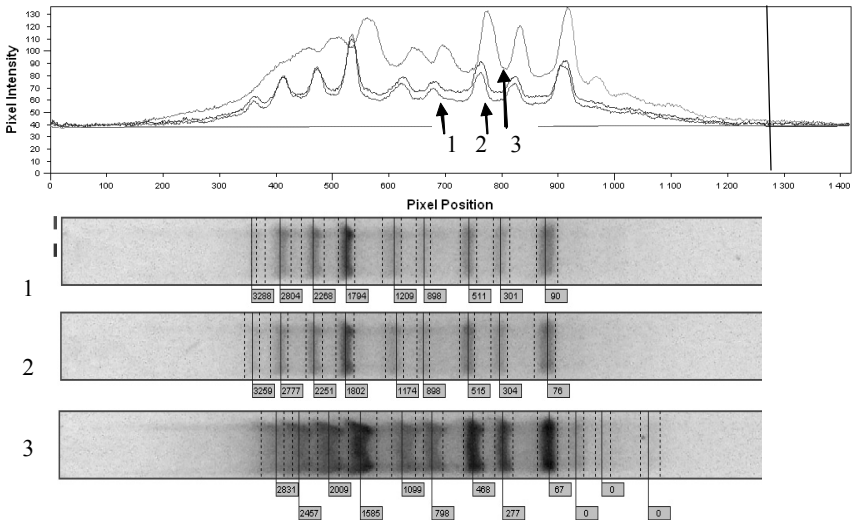


Рис.2. Денситограма геномного фінгерпринту Alu-інтегранта *B. subtilis* ІМБГ187 (3) порівняно з контрольними штамми SHgw (1) та Lys-42 (2)

смужка від старту, рис. 2), який є характерним для досліджуваного Alu-інтегранта і деяких його похідних.

Зокрема, визначення асоціації фрагмента №4 з мутантними фенотипами показало, що похідні Alu-інтегранта, які мають розміри колоній від 2 до 10 мм (за винятком клону 18) втрачають зазначені особливості нестабільного мутанта і за фінгерпринтом не відрізняються від контрольних штамів (рис. 1, гель А). Поряд з цим, у мозаїка 31, колонії якого за розміром в 5 разів перевищували норму, на молекулярному рівні зафіксовано кількісні і якісні відмінності в високомолекулярній частині отриманого патерну (від 1600 нп), як від батьківського штаму, так і від контрольних варіантів (рис. 1, гель Б). Також звертає на себе увагу більш інтенсивна ампліфікація трьох нижніх фрагментів у субклонів 31 і 32, що не спостерігалось у ревертантів з фенотипом Lys^+Orn^+ і у субклону 33. За стандартизації кількості ДНК-матриці в реакції, виявлені відмінності виходу продукту можна віднести за рахунок активності еукаріотного МГЕ в межах ділянки ДНК, що фланкована послідовностями сімейства BOX.

Відомо, що присутність Alu-повтору (розмір 300 нп) у регуляторній зоні може впливати на експресію генів, а інтеграція у кодуючу послідовність ДНК підвищує темпи виникнення мутацій та спричиняє генетичну нестабільність [1, 2]. Одержані результати дозволяють висловити припущення, що мутаційні події, які призводять до суттєвого порушення росту колоній в поколіннях нестабільного мутанта за наявності в геномі Alu-повтору людини, пов'язані з перебудовами в певних ділянках, що фланковані BOX-послідовностями. Секвенування найбільш характерних ампліконів мутантів, зокрема фрагменту №4, дозволить з'ясувати точну природу мутаційних змін і їхню локалізацію.

Перспективним видається використання даної моделі для попереднього дослідження цитостатичної дії різноманітних високо- та низькомолекулярних біологічно активних речовин, зокрема, лектинів, антибіотиків, тощо.

Висновки

Методом гер-ПЛР з використанням BOX-праймерів, виявлено кількісні і якісні відмінності патернів ДНК Alu-інтегранта *B. subtilis*, як від стандартних штамів, так і субклонів з ознаками суттєвого порушення росту колоній.

На найбільш характерні зміни виявлено в ампліконі №4, що може бути потенційним маркером, асоційованим з даним фенотипом.

Література

1. Batzer M.A., Deininger P.L. Alu repeats and human genomic diversity // Nature reviews.— 2002.— Vol.3, N1.— P. 370–380.
2. Карпова І.С., Корецька Н.В., Лялюцька Т.С. Розвиток ідей С.М. Гершензона у дослідженні адаптивності мутацій // Физиология и биохимия культурных растений.— 2006.— Т.38, №2.— С. 124–133.
3. Lupski J.R., Wienstock G.M. Short, interspersed repetitive DNA sequences in procariotic genomes // Journ. of Bacter.— 1992.— Vol.174, N14.— P. 4525–4529.

4. Rademaker J.L.W., Buijn F.J. Characterization and classification of microbes by Rep-PCR genomic fingerprinting and computer-assisted pattern analysis // Appl. Envir. Microbiol.— 1998.— Vol.64.— P. 2096–2104.

5. Карпова И.С., Горовенко Н.Г., Подольская С.В., Россоха З.И., Корецкая Н.В., Дмитренко В.В., Рымарь С.Е. Инсерционный механизм ДНК-мутагенеза // Вісн. Укр. товариства генетиків і селекціонерів.— 2006.— Т.4, №1.— С. 124–129.

6. Кузьменко О.Л., Негруцька В.В., Пальчиковська Л.Г., Карпова І.С., Лукаш Л.Л. Застосування методу геномного фінгерпрінтингу (REP-ПЛР) для дослідження інсерційних мутантів *Bacillus subtilis* // Фактори експериментальної еволюції організмів.— К.: Логос.— 2009.— Т.7.— С. 32–36.

7. Sakaguchi K. Invertrons, a class of structurally and functionally related genetic elements that includes linear DNA plasmids, transposable elements, and genomes of adenovirus // Microbiol. Rev.— 1990.— Vol.54, N1.— P. 66–74.

Резюме

Методом гер-ПЛР з використанням ВОХ-праймерів, виявлено кількісні і якісні відмінності патернів ДНК Alu-інтегранта *B. subtilis*, як від стандартних штамів, так і субклонів з ознаками суттєвого порушення росту колоній.

Посредством метода гер-ПЦР с использованием ВОХ-праймеров выявлены количественные и качественные отличия паттернов ДНК Alu-интегранта *B. subtilis* как от стандартных штаммов, так и субклонов с признаками существенного изменения роста колоний.

Quantitative and qualitative deviations in DNA patterns from control and derivatives of the *B. subtilis* strain which contain Alu-insertion were shown using rep-PCR method with primers to BOX elements.

**КОНОВАЛОВ В.С., КОПЫЛОВ К.В., СТАРОДУБ Л.Ф.,
АЛЕКСЕЕНКО Т.И., ШЕБУНЬКО М.В.**

Институт разведения и генетики животных НААН, Украина.

Научно-методический центр, Украина. e-mail konovalov_vs@ukr.net

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ РИСКИ И УПРАВЛЕНИЕ ИМИ В СЕЛЕКЦИОННОМ ПРОЦЕССЕ

Современные методико-технологические достижения молекулярной генетики позволили не только углубить понимание механизмов мутационного процесса, но и понять, что существенная часть “нейтральных” мутаций [1], на самом деле представляют собой рецессивные “молчащие” мутации проявляющие свои кодоминантные свойства как адаптивный ответ на меняющийся уровень антропогенного давления [2]. Реализация ранее скрытой от селекционера изменчивости обязывает нас глубже анализировать проблемы генетического груза и дифференцировать генетические риски в зависимости от их влияния на гомеостатические механизмы жизнеспособности и воспроизводительной способности организма. В этой связи в методологии фено-цитогенетического мониторинга наследственных патологий раз-