

УДК 575.22

## ВЫЯВЛЕНИЕ АЛЛЕЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ МАРКЕРОВ МЕТОДАМИ КАПИЛЛЯРНОГО И ТРАДИЦИОННОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

© 2016 г. Г. А. Рубцова<sup>1,2</sup>, Е. В. Пономарева<sup>3</sup>, К. И. Афанасьев<sup>1,2</sup>, Е. Г. Шайхаев<sup>4</sup>, М. В. Холодова<sup>5</sup>, С. Д. Павлов<sup>3</sup>, Л. А. Животовский<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Институт общей генетики имени Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва 119991  
e-mail: levazh@gmail.com

<sup>2</sup>Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии, Москва 107140

<sup>3</sup>Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, кафедра ихтиологии, Москва 119234

<sup>4</sup>Российский научный центр рентгенорадиологии, Москва 117997

<sup>5</sup>Институт проблем экологии и эволюции имени А.Н. Северцова Российской академии наук, Москва 119071

Поступила в редакцию 17.06.2015 г.

Микросателлитные аллели выявляют методом ПЦР (полимеразной цепной реакции), обеспечивающим многократное увеличение числа копий (амплификацию) данного фрагмента ДНК. Для их визуализации имеются два разных метода: фрагментный анализ путем капиллярного электрофореза денатурированной ДНК и разделение их в блоке неденатурирующего геля с последующей его окраской. Первый метод более точный и автоматизированный, однако дорогой. Второй метод гораздо дешевле, но менее удобен: требует ручной обработки и предположительно менее точный. В данной работе мы приводим результаты сравнения типирования аллелей девяти микросателлитных локусов указанными двумя методами для одного из видов тихоокеанских лососей — нерки *Oncorhynchus nerka* Walbaum. В подавляющем большинстве случаев оба метода дали идентичные размеры фрагментов или с константной разницей, если аллели имели относительно небольшие размеры — не более 200–220 пн.

**Ключевые слова:** нерка, микросателлитный локус, ДНК-маркер, ПЦР, электрофорез, идентификация аллелей.

**DOI:** 10.7868/S0016675816040081

Микросателлитные локусы представляют собой фрагменты ДНК с тандемно повторяющимися идентичными повторами, называемыми также мотивами — короткими последовательностями из нескольких пар нуклеотидов (как обычно принято — от одной до шести), являются важными полиморфными маркерами ДНК у человека, растений и животных, встречаются во всех участках генома [1]. Они отличаются высокой скоростью мутирования [2], порядка 0.1% и выше на локус на поколение, что позволяет эффективно исследовать эволюционные процессы на коротких промежутках времени. Обычно по микросателлитным маркерам встречается 5–10 аллелей, порой больше (отличающихся друг от друга в основном числом повторов), что позволяет детально характеризовать полиморфизм популяций. По микросателлитам созданы обширные базы данных, которые предположительно еще будут долго использоваться в целях идентификации особей популяций экономически важных, немодельных

видов. Что важно для анализа получаемых данных, изменчивость микросателлитных локусов хорошо описывается развитым математическим аппаратом современной популяционной генетики [3].

Микросателлитные аллели выявляют методом ПЦР (полимеразной цепной реакции), обеспечивающим многократное увеличение числа копий (амплификацию) данного фрагмента ДНК. Их визуализацию осуществляют различными методами, наиболее точный и автоматизированный — фрагментный анализ путем капиллярного электрофореза денатурированной ДНК [4]. Однако этот метод дорогой, поэтому при ограниченных ресурсах возможно определить аллели иначе — путем разделения их в блоке неденатурирующего геля с последующей окраской геля [5]. Последний является простым и дешевым методом, хотя и трудоемким, но его основной недостаток — это проблемы с определением очень больших и очень малых по размеру аллелей: первые остаются в на-

чале “старта” и их трудно или даже невозможно идентифицировать, а вторые – “убегают” к другому краю геля, где могут быть ошибочно определены или утеряны. Поэтому важно выявить пределы использования этого метода путем сравнения с результатами капиллярного электрофореза одних и тех же образцов ДНК. Кроме того, не исключена возможность возникновения ошибок при использовании различных протоколов амплификации, различных праймеров для амплификации одного и того же локуса, различных платформ для электрофореза, вследствие модификаций третичной структуры нативной ДНК при электрофорезе в неденатурирующем геле – все это ведет к ошибочному определению размера аллелей [6].

В наших популяционных исследованиях на лососевых рыбах, где требуется исследовать многие сотни особей (десятки выборок, часто порядка 50 или больше особей на выборку), мы использовали второй метод, в частности, при изучении кеты Дальнего Востока [7–10]. Для верификации этого метода мы провели сравнительное исследование по микросателлитам кеты совместно с коллегами из Университета штата Аляска (A.J. Gharrett), которое показало удовлетворительное совпадение по исследованным маркерам (неопубликовано), что указало на возможность успешной работы этим методом в популяционно-генетических исследованиях.

В данной работе мы приводим результаты сравнения типирования аллелей микросателлитных локусов указанными двумя методами для другого вида тихоокеанских лососей – нерки *Oncorhynchus nerka* Walbaum.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выборка нерки из оз. Азабачьего (бассейн р. Камчатка, 10–13 июля 2008 г.) в количестве 30 экз. была проанализирована по 9 микросателлитным локусам: *One105*, *One109*, *One112*, *One115* [11]; *OMM1037*, *OMM1070* [12]; *Ots107* [13], *OtsG253b* [14], *Oki6* [15]. Все локусы, кроме последнего, – с тетра nukлеотидными повторами.

**Капиллярный электрофорез.** Экстрагированная ДНК хранилась в морозильнике при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Прямые праймеры синтезировались с флуоресцентной меткой, с использованием четырех красителей (ROX, TAMRA, FAM, R6G). Амплификационная смесь с конечным объемом 10 мкл состояла из:  $10\times$  *Taq*-буфера, 2 мМ  $\text{Mg}^{2+}$ , 2.5 мМ dNTPs (все реактивы фирмы ДИАЛАТ Лтд), 0.5 пМ каждого праймера, 0.5 U *Taq*-полимеразы (ДИАЛАТ Лтд), 1.5 мкл ДНК, до необходимого объема смесь доводили деионизованной водой. Амплификацию локусов проводили в термоциклере Tetrad 2 (Bio-Rad Laboratories, Inc.) по схеме: 1 цикл  $94^{\circ}\text{C}$

4 мин, затем 30 циклов по 15 с  $94^{\circ}\text{C}$ , 20 с *ta*, 20 с  $72^{\circ}\text{C}$ , заключительная элонгация  $72^{\circ}\text{C}$  – 10 мин. Температура отжига (*ta*) для праймеров была  $54$ – $62^{\circ}\text{C}$  (в зависимости от праймеров): *Oki6* –  $54^{\circ}\text{C}$ ; *One105*, *One109*, *One112*, *Ots107*, *OtsG253b*, *OMM1037*, *OMM1070* –  $56^{\circ}\text{C}$ ; *One115* –  $62^{\circ}\text{C}$ . Перед постановкой на электрофорез разведенные амплификаты ( $\sim 120$  раз) денатурировали с формамидом, в каждую пробу добавлялся стандарт GeneScan™ 500 LIZ®. Капиллярный гель-электрофорез проводили в генетическом анализаторе ABI PRISM 3500. Определение длин аллелей проводили в программе GeneMarker v. 1.2 (SoftGenetics LLC).

**Электрофорез в блоке неденатурирующего геля.** Для успешного определения размеров аллелей вторым методом для некоторых локусов мы подбирали праймеры, дающие более короткие продукты амплификации (указаны ниже). ПЦР проводили в амплификаторе MJ Research PTC-100 с использованием готовых лиофилизированных смесей для ПЦР Gene Pak PCR Core фирмы “Изо-Ген” (Россия), с добавлением 5 мкл смеси праймеров (конечная концентрация 0.5 мкМ) и 5 мкл геномной ДНК (100 нг). Фракционирование продуктов амплификации проводили с помощью электрофореза в 6%-ном неденатурирующем полиакриламидном геле в  $0.5\times$  TBE буфере при напряжении 300 В в течение 2–5 ч. Полученные фореграммы окрашивали бромистым этидием и документировали в ультрафиолетовом свете. В качестве маркеров длин фрагментов использовали ДНК плазмиды pBR322, обработанные рестриктазами *HaeIII* и *HpaII*. Размеры аллелей определяли с использованием программы 1D Image Analysis Software Version 3.5 фирмы “Кодак”.

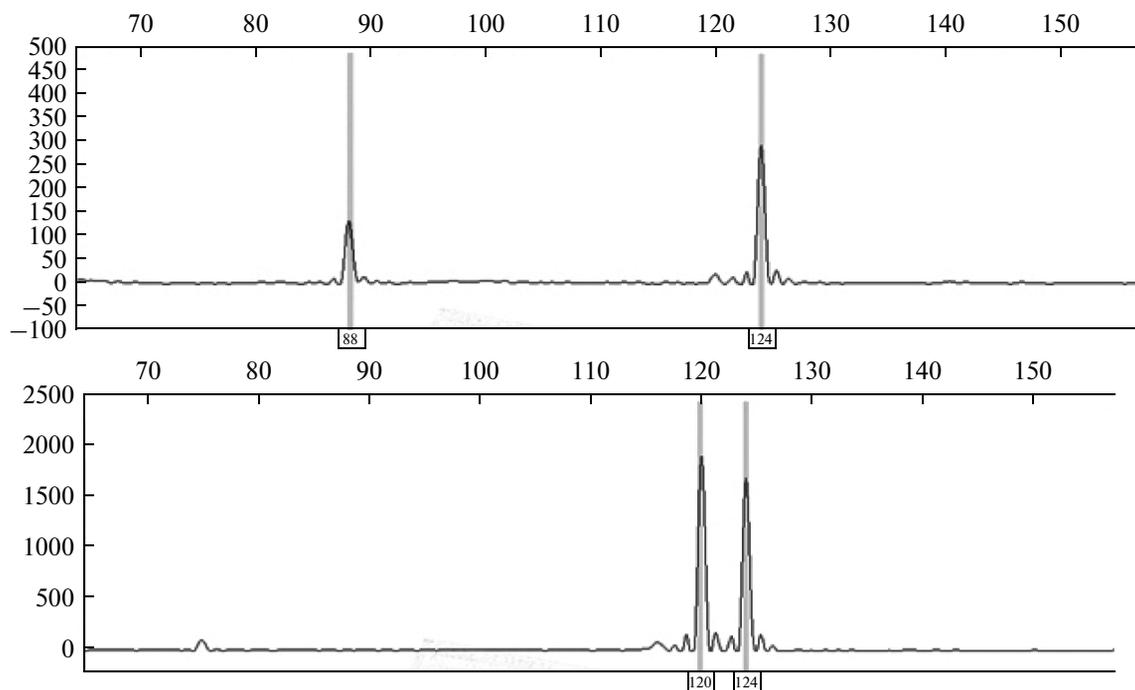
Размеры получаемых фрагментов в тексте статьи даем те, что были определены методом капиллярного электрофореза.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

*One105.* Оба метода дали идентичные результаты с константной разницей на 3 нуклеотида меньше во втором методе. Размеры аллелей: от 130 до 142 пн, наиболее частый – 134 пн.

*One109.* Использованы модифицированные праймеры укороченного локуса, обозначенного нами как *One109G*: F <gag-agg-gag-aga-gtg-tct-ttg>; R <gta-gca-tca-gct-cac-taa-tgg-gat-aat-a>. Оба метода показали идентичные результаты с константной разницей на 17 пн меньше во втором методе, что вызвано использованием праймеров, теснее примыкающих к телу микросателлита. Размеры аллелей: от 124 до 172 пн, наиболее частые аллели 164 и 128 пн.

*One112.* Константная разница в 1 пн меньше во втором методе. Различия между методами выяв-



**Рис. 1.** Локус *Ots107*. Капиллярный электрофорез. Гетерозигота с “аномальным” аллелем 88 пн (верхний рисунок) и гетерозигота с нормальными аллелями (внизу).

лены для наибольших для этого локуса аллелей: размером 208 пн и больше. В четырех случаях (208, 212 и 216 пн) различия были на 7 пн больше во втором методе (т.е. на два повтора, с учетом константной разницы в 1 пн), а для самого большого аллеля (224 пн) различие увеличилось до 11 пн (т.е. на три повтора). По-видимому, в этих случаях имели место особенности третичной структуры неденатурированных фрагментов ДНК больших размеров.

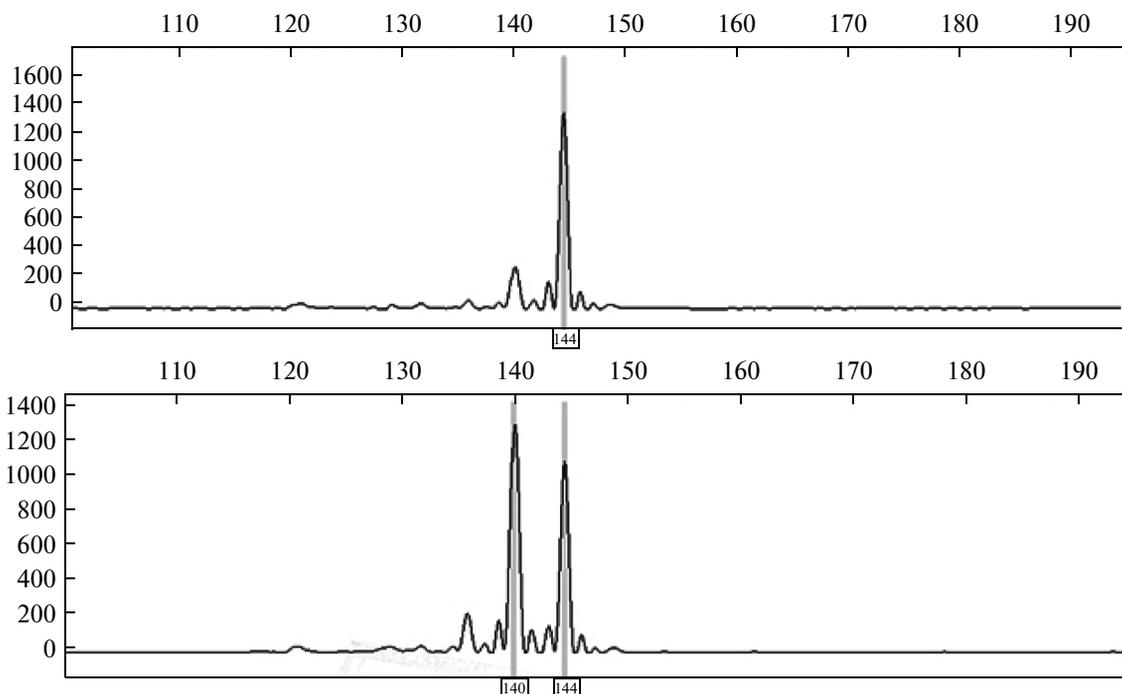
*One115*. Также использованы модифицированные праймеры, локус обозначен *One115G*: F <сса-тгг-тат-атт-ггс-агс-кат-тт>; R <ааа-тац-тт-тт-гсс-сса-сгг-таг>. Результаты обоих методов идентичные, константная разница на 1 нуклеотид – больше во втором методе.

*ОММ1037*. Использованы модифицированные праймеры, локус обозначен *ОММ1037G*: F <гаа-сгг-сга-сгг-гат-тта-ата-сг>; R <сгг-сгс-агс-сгс-ггс-тгс-таа>. Результаты идентичные, константная разница на 2 нуклеотида больше во втором методе. Всего встречено три аллеля с размерами: 206 (наиболее частый), 210 и 214 пн.

*ОММ1070*. Константная разница в 2 пн больше во втором методе. Основной спектр аллелей – от 146 до 206 пн, наиболее частый – 170 пн. Встречены единичные аллели больших размеров: 230 пн и больше (всего 6 таких аллелей) в гетерозиготном состоянии с аллелями из основного спектра. Пять из них вторым методом не были выявлены и эти

генотипы были документированы как гомозиготы по коротким аллелям. Один большой аллель (размером 234 пн) все же был выявлен вторым методом, вероятно потому, что он был в гетерозиготе с относительно близким по размеру аллелем (202 пн) и потому его легче было визуализировать.

*Ots107*. Результаты идентичные, с константной разницей на 2 нуклеотида меньше во втором методе. Размеры аллелей: 88, 116, 120 (наиболее частый), 124 и 128 пн. Интересно отметить, что “артефактный” аллель 88 пн (артефактный – в смысле резко отличающийся по размеру) встретился 3 раза в гетерозиготе с аллелями 120 и 124 пн. Этот аллель оказался артефактным и в прямом смысле: первым методом в двух случаях он показал меньшую интенсивность пика по сравнению с другими, “нормальными” аллелями (рис. 1), хотя должно было бы быть наоборот: большая его интенсивность вследствие ожидаемой более высокой скорости его амплификации, как более короткого по размеру аллеля. Вторым методом размеры этих аллелей соответствовали положению пиков первого метода, так что для этого локуса оба метода дали полностью идентичные результаты. Можно предположить, что аллель 88 пн произошел от делеции, удалившей несколько повторов и затронувшей праймерную зону, вследствие чего этот аллель стал хуже амплифицироваться; однако третья гетерозигота по этому аллелю по-



**Рис. 2.** Лocus *OtsG253b*. Верхний рисунок: капиллярный электрофорез идентифицирует этот образец как гомозиготу 144/144, хотя второй метод указал, что это гетерозигота 132/144. Нижний рисунок: образец идентифицируется первым методом как гетерозигота (140/144), что совпало в данном случае с вторым методом (см. текст).

казала ожидаемую интенсивность пиков в первом методе, так что интерпретация случаев меньшей интенсивности этого аллеля неясна. Вторым методом аллель 88 пн хорошо различался.

*OtsG253b*. Размеры аллелей: от 120 до 152 пн, наиболее частый – 144 пн; кроме них, обнаружен один аллель размера 164 пн. По большей части отмечалось совпадение результатов обоих методов. Однако в восьми случаях у генотипов, идентифицированных вторым методом как гетерозиготы, первый метод не смог определить меньшие по размеру аллели (128 и 132 пн), хотя они находятся в середине выявленного аллельного спектра, и определял образцы как гомозиготные (рис. 2, верхний рисунок); при этом другие аллели выявлялись в гетерозиготном состоянии (рис. 2, нижний рисунок). Проверка соотношений Харди–Вайнберга показала значимое отклонение по генотипам, выявленным первым методом ( $p = 0.039$ ), в то время как эти соотношения соблюдались при генотипировании вторым методом ( $p = 0.72$ ). Поэтому можно сделать вывод, что в данном случае первый метод не смог распознать указанные аллели. Причины этого неясны.

*Okib*. По этому маркеру первым методом выявлены только два аллеля: 75 и 86 пн, отличающихся друг от друга на 11 пн. Вторым методом были выявлены также два аллеля, но с разницей 10 пн (77 и 87 пн). Обычно в таких ситуациях абсолютные

размеры аллелей могут определяться разными методами по-разному, однако относительные их различия сохраняются, но в нашем случае это не так (11 и 10 пн). В чем причина такого отклонения – неясно.

Метод генотипирования микросателлитных маркеров нерки путем электрофореза амплифицированных фрагментов ДНК в блоке неденатурирующего геля можно считать удовлетворительным для локусов с аллелями относительно небольших размеров – меньших 200–220 пн. Большие по размеру аллели могут неточно идентифицироваться этим методом. Для локуса *OtsG253b* капиллярный электрофорез не позволил идентифицировать некоторые аллели: гетерозиготы по ним определялись как гомозиготы по второму аллелю. Других несоответствий между сравниваемыми методами не выявлено.

Молекулярная природа выявленных расхождений между обоими методами не исследовалась. Для этого необходимо стандартизировать условия эксперимента для обоих методов, так как в нашем исследовании они были разные: велись разными исследовательскими группами, хотя на одних и тех же образцах: одна лаборатория – одним методом, другая – другим. В частности, в нашем исследовании амплификация проводилась по-разному для каждого метода (см. Материалы и методы) и не исключено, что в каких-то случаях

причина расхождений в определении размера аллеля обусловлена еще и этим. Однако во всех случаях расхождения эти аллели должны секвенироваться.

Если не учитывать константные различия в размере аллелей, определяемых разными методами (которые не влияют на относительную разницу в размере аллелей в пределах каждого метода и потому не привносят ошибок в популяционно-генетический анализ полученных данных), то из 540 аллель-тестов (30 диплоидных особей, 9 локусов) нами выявлено 10 несоответствий аллельных размеров, т.е. менее 2%. К сравнению, широкое исследование по генотипированию атлантического лосося в 12 североамериканских и европейских лабораториях по 16 микросателлитным локусам показало, что после калибровки (т.е. после устранения межлабораторных константных различий в определении размера аллелей) средняя внутрилабораторная ошибка снизилась до 1%, колеблясь от 0.2 до 2.7% в разных лабораториях [6]. Отметим также, что все десять неверных определений размера аллелей вторым методом касались только двух локусов из девяти исследованных — *One112* и *ОММ1070*.

Таким образом, наше исследование показало, что электрофорез амплифицированных микросателлитных аллелей в блоке неденатурирующего полиакриламидного геля вполне адекватен для популяционных исследований. Тем не менее мы рассматриваем это исследование как предварительное для нерки, так как имеются другие локусы, перспективные для популяционных исследований — они также требуют подобной проверки.

Выражаем глубокую признательность М.Ю. Ковалеву (ИБМ ДВО РАН) за помощь в сборе материала по нерке и анонимному рецензенту статьи за полезные замечания.

Работа была поддержана грантами Программы РАН “Биоразнообразии природных систем”, подпрограмма “Генофонды” и РФФИ № 15-04-02511 (Л.Ж.), 14-04-01437 (С.П.) и РФФ № 14-50-00029 (участие Е.В. Пономаревой).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Weber J.L., Broman K.W.* Genotyping for human whole-genome scans: past, present, and future // *Advances in Genetics*. 2001. V. 42. P. 77–96.
2. *Dib C., Faure S., Fizames C. et al.* A comprehensive genetic map of the human genome based on 5.264 microsatellites // *Nature*. 1996. V. 380. P. 152–154.
3. *Животовский Л.А.* Микросателлитная изменчивость в популяциях человека и методы ее изучения // *Информацион. вестн. ВОГиС*. 2006. Т. 10. № 1. С. 74–96.
4. *Butler J.M.* *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology*. Amsterdam; N.Y.: Elsevier, 2011.
5. *Афанасьев К.И., Рубцова Г.А., Малинина Т.В. и др.* Микросателлитная изменчивость и дифференциация популяций кеты (*Oncorhynchus keta* Walbaum), воспроизводимых сахалинскими рыболовными заводами // *Генетика*. 2006. Т. 42. № 12. С. 1694–1702.
6. *Ellis J.S., Gilbey J., Armstrong A. et al.* Microsatellite standardization and evaluation of genotyping error in a large multi-partner research programme for conservation of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) // *Genetica*. 2011. V. 139. № 3. P. 353–367.
7. *Афанасьев К.И., Рубцова Г.А., Шитова М.В. и др.* Межрегиональная дифференциация кеты Сахалина и Южных Курил по микросателлитным локусам // *Генетика*. 2008. Т. 44. № 7. С. 956–963.
8. *Рубцова Г.И., Афанасьев К.И., Малинина Т.В. и др.* Дифференциация популяций кеты (*Oncorhynchus keta* Walbaum) по микросателлитным и аллозимным маркерам: сравнительный анализ // *Генетика*. 2008. Т. 44. № 7. С. 964–971.
9. *Шитова М.В., Афанасьев К.И., Рубцова Г.А. и др.* Микросателлитная изменчивость заводских популяций кеты (*Oncorhynchus keta* Walbaum) о. Сахалин // *Вопр. рыболовства*. 2009. Т. 10. № 1–37. С. 102–115.
10. *Животовский Л.А., Рубцова Г.И., Шитова М.В. и др.* База микросателлитных ДНК-данных по кете Дальнего Востока России // *Реализация “Концепции дальневосточной бассейновой программы изучения тихоокеанских лососей”* // Под ред. Шунтова В.П. Владивосток: ТИНРО-центр, 2010. Бюл. № 5. С. 53–63.
11. *Olsen J.B., Wilson S.L., Kretschmer E.J. et al.* Characterization of 14 tetranucleotide microsatellite loci derived from sockeye salmon // *Mol. Ecol.* 2000. V. 9. № 12. P. 2185–2187.
12. *Rexroad C.E. III, Coleman R.L., Martin A.M. et al.* Thirty five polymorphic microsatellite markers for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // *Anim. Genet.* 2001. V. 32. № 5. P. 317–319.
13. *Nelson R.J., Beachem T.D.* Isolation and cross species amplification of microsatellite loci useful for study of Pacific salmon // *Anim. Genet.* 1999. V. 30. № 3. P. 228–229.
14. *Хрусталева А.М.* Комплексный метод дифференциации нерки (*Oncorhynchus nerka*). М.: Изд-во ВНИРО, 2007. 164 с.
15. *Smith C.T., Koop B.F., Nelson R.J.* Isolation and characterization of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) microsatellites and their use in other salmonids // *Mol. Ecol.* 1998. V. 7. № 11. P. 1614–1616.

## A Detection of Allelic Variants at Microsatellite Markers by Using Capillary and Traditional Electrophoresis

G. A. Rubtsova<sup>a, b</sup>, E. V. Ponomareva<sup>c</sup>, K. I. Afanasiev<sup>a, b</sup>, E. G. Shaikhaev<sup>d</sup>,  
M. V. Kholodova<sup>e</sup>, S. D. Pavlov<sup>c</sup>, and L. A. Zhivotovsky<sup>a, b</sup>

<sup>a</sup>*Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia*  
*e-mail: levazh@gmail.com*

<sup>b</sup>*Russian Federal Research Institute of Fisheries and Oceanography, Moscow, 107140 Russia*

<sup>c</sup>*Department of Ichthyology, Moscow State University, Moscow, 119234 Russia*

<sup>d</sup>*Russian Scientific Center of Roentgen Radiology, Moscow, 117997 Russia*

<sup>e</sup>*Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

Microsatellite alleles are detected by PCR (polymerase chain reaction) that provides a manifold increase in the number of copies (amplification) of a given DNA fragment. The fragment visualization can be reached by two different methods. These are fragment analysis by capillary electrophoresis in denaturing gel and fragment separation in non-denaturing gel with subsequent gel staining. The first method is more accurate and automated, but expensive. The second method is much cheaper but less convenient. It requires manual processing and is presumably less accurate. In this study, we present the results of comparison of the allele typing at nine microsatellite loci using these two methods for one of the species of Pacific salmon, sockeye salmon *Oncorhynchus nerka* Walbaum. In most cases, both methods give identical fragment sizes or a constant difference if the alleles are relatively small (not larger than 200–220 bp).

*Keywords:* sockeye salmon, microsatellite locus, DNA marker, PCR, electrophoresis, allele identification.